



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Novica Z. Bojanić

**PROTEKTIVNI EFEKAT BLOKATORA
KALCIJUMOVIH KANALA NA
INTOKSIKACIJU ALUMINIJUMOM:
EKSPERIMENTALNI MODEL**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Novica Z. Bojanić

**PROTECTIVE EFFECT OF CALCIUM
CHANNEL BLOCKER ON ALUMINIUM
INDUCED INTOXICATION:
AN EXPERIMENTAL MODEL**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Dr Dijana Stojanović, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Naslov: Protektivni efekat blokatora kalcijumovih kanala na intoksikaciju aluminijumom: eksperimentalni model

Uvod. Aluminijum je neesencijalni element, treći po zastupljenosti u Zemljinoj kori. Od druge polovine dvadesetog veka progresivno raste upotreba i izloženost živog sveta toksičnom uticaju bioraspoloživog aluminijuma. Aluminijumu smo eksponirani preko vode, hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda, kao i preko aerozagađenja. Rezultati savremenih istraživanja povezuju intoksikaciju aluminijumom sa pojavom anemije, osteoporoze, encefalopatije i niza neurodegenerativnih bolesti (Alchajmerove bolesti, parkinsonizma, autizma), reproduktivne toksičnosti, respiratornih oboljenja (astma, hronični bronhitis), imunoloških poremećaja i karcinoma dojke. Aluminijum se koristi kao adjuvans u vakcinama, jer pojačava imuni odgovor. U vreme pojave novih virusa i jačanja antivakcinalnog pokreta i straha da je aluminijum iz vakcina odgovoran za porast pojave autizma, veoma je važno naći način za umanjene njegove akumulacije i toksičnog delovanja. Patogenetski mehanizmi toksičnog delovanja aluminijuma su nedovoljno razjašnjeni. Rezultati kliničkih i eksperimentalnih studija ukazuju da postoji više patogenetskih mehanizama kojima Al ispoljava toksično delovanje na ćelije: oksidativni stres, remećenje funkcije membrana, promena ili inhibicija funkcije enzima, i poremećaj unutarćelijske signalizacije. Utvrđeno je da joni aluminijuma mogu modifikovati različite signalne puteve i funkcije sekundarnih glasnika, koji su uključeni u esencijalne procese kao što su rast ćelija, diferencijacija i apoptoza

Ciljevi istraživanja su proizašli iz hipoteze da poremećaj regulacije homeostaze kalcijuma predstavlja snažan patogenetski mehanizam u razvoju aluminijumske toksičnosti i da se blokiranjem njegovim kanala može ublažiti i/ili eliminisati efekat hronične ekspozicije aluminijumu. Cilj je bio da se:

- razjasni mehanizam toksičnog delovanja aluminijuma preko uticaja na kalcijumove kanale i utvrdi mogući protektivni uticaj pretretmana blokadom kalcijumovih kanala pomoću verapamila,
- ispita uticaj hronične administracije aluminijuma i premedikacije verapamilom na promena hematoloških i biohemijskih parametara
- proceni deponovanje aluminijuma u tkivu jetre, testisa i bubrega i omogući protektivni efekat verapamila
- ispita uticaj hronične ekspozicije različitim dozama aluminijum trihlorida i premedikacije verapamilom na morfologiju testisa.
- ispita uticaj hronične ekspozicije različitim dozama aluminijum trihlorida i premedikacije verapamilom na morfologiju jetre.
- ispita stepen apoptoze nakon hronične administracije aluminijuma i premedikacije verapamilom u tkivima testisa i jetre primenom apoptotskih proteina Bcl-2 porodice.

Materijal i metode: u eksperiment je uključeno 36 mužjaka *Sprague Dawley* pacova, koji su podeljeni u 6 grupa koje su tretirane na sledeći način: fiziološkim rastvorom kontrola (K), verapamilom (V), E1 sa 10 mg i E2 sa 20 mg $AlCl_3$. Šezdeset minuta nakon premedikacije verapamilom E3 je primila 10 mg a E4 20 mg $AlCl_3$. Nakon 8 nedelja životinje su žrtvovane i uzeta je krv za analizu hematoloških i biohemijskih parametara i tkiva za patohistološka ispitivanja; za određivanje sadržaja aluminijuma u njima i procenu apoptotskih dešavanja.

Rezultati: prezentovani su rezultati hematoloških testova (broj eritrocita, leukocita, trombocita, relativna i apsolutna leukocitarna formula, koncentracije hemoglobina, hematokrit, MCV, MCH, MCHC, gvožđe, feritin, transferin, hepcidin, UIBC, TIBC, TSAT; aktivnost enzima (aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze, amilaze, laktat dehidrogenaze, kreatin kinaze i gama-glutamil transferaza; koncentracija CRP-a; koncentracija aluminijuma u tkivu jetre, testisa i bubrega; patohistološki nalazi tkiva jetre i testisa (dobijeni klasičnom hematoksilin-eozin metodom bojenja); morfometrije testisa i imunohistohemijske citoplazmatske ekspresije Bax, Bid i Bcl-2 u tkivu jetre i testisa.

Diskusija: objašnjeni su rezultati i diskutovani patogenetski aspekti promena nastalih usled intoksikacije aluminijumom i protektivni efekti premedikacije verapamilom na hematološke i biohemijske parametere i na akumulaciju aluminijuma u tkivu jetre i testisa. Data je analiza patogenetskog aspekta toksičnog delovanja aluminijuma preko uticaja na homeostazu kalcijuma i upoređeno su diskutovani najnoviji literaturni podaci.

Zaključak: dokazano je da hronično aplikovanje aluminijuma dovodi do značajnih promena hematoloških i biohemijskih parametara sa izraženim dozno-zavisnim karakterom; verifikovane su hematološke promene (mikrocitno-hipohromna anemija, leukocitoza, trombocitoza i povišene vrednosti hepcidina i feritina); utvrđeno je da premedikacija verapamilom prouzrokuje statistički značajno poboljšanje hematološkog i biohemijskog fenotipa. Dokazano je značajno taloženje aluminijuma u tkivu jetre, bubrega i testisa, kao i da je premedikacija verapamilom dovela do statistički značajnog smanjenja taloženja aluminijuma u pomenutim tkivima. Imunohistohemijskim bojenjem dokazana je visoka ekspresija proapoptotskih markera Bax i Bid, koja je bila najizraženija u tkivu testisa i utvrđen je visok stepen apoptoze izražen proapoptotskim markerima Bax i Bid u mladim ćelijama germinativnog epitela, ali i u Lejdigovim ćelijama. Dokazano je da su ove promene bile ublažene u slučajevima premedikacije verapamilom i ukazano na mogući protektivni uticaj farmakološke blokade kalcijumovih kanala verapamilom.

Naučna
oblast:
Naučna
disciplina:

Medicinske nauke

Patofiziologija

Ključne reči:	Hronična intoksikacija aluminijumom, blokada voltažno zavisnih kalcijumovih kanala, verapamil, apoptoza, morfometrija
UDK:	616-092;[669.71:615.9(043.3)
CERIF klasifikacija:	B 530
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Dr Dijana Stojanović, assistant professor, Faculty of medicine Niš, University of Niš
Title:	Protective effect of calcium channel blocker on aluminium induced intoxication: an experimental model
Abstract:	<p>Introduction. Aluminum is a non-essential element, the third most abundant in the Earth's crust. Since the second half of the twentieth century, the use and exposure of the living world to the toxic effects of bioavailable aluminum has been progressively increasing. We are exposed to aluminum through water, food, pharmaceutical and cosmetic products, as well as through air pollution. The results of modern research link aluminum intoxication with the occurrence of anemia, osteoporosis, encephalopathy and a number of neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, parkinsonism, autism), reproductive toxicity, respiratory diseases (asthma, chronic bronchitis), immune disorders and breast cancer. Aluminum is used as an adjuvant in vaccines, because it strengthens the immune response. At the time of the emergence of new viruses and the strengthening of the anti-vaccine movement and the fear that aluminum from vaccines is responsible for the increase in autism, it is very important to find a way to reduce its accumulation and toxic effects. The pathogenetic mechanisms of the toxic action of aluminum are insufficiently elucidated. The results of clinical and experimental studies indicate that there are several pathogenetic mechanisms by which Al exhibits toxic effects on cells: oxidative stress, disruption of membrane function, alteration or inhibition of enzyme function, and disruption of intracellular signaling. It has been found that aluminum ions can modify various signaling pathways and functions of secondary messengers, which are involved in essential processes such as cell growth, differentiation and apoptosis.</p> <p>The objectives of the study were based on the hypothesis that the disturbance of calcium homeostasis regulation represents a strong pathogenetic mechanism in the development of aluminum toxicity and that blocking its channels can mitigate and/or eliminate the effect of chronic exposure to aluminum. The aim was:</p> <ul style="list-style-type: none">- to elucidate the mechanism of toxic action of aluminum through the effect on calcium channels and determine the possible protective effect of pretreatment by blocking calcium channels with verapamil,- to examine the influence of chronic administration of aluminum and premedication with verapamil on changes in hematological and biochemical parameters- to assess the deposition of aluminum in the liver, testis and kidney tissues and the possible protective effect of verapamil- to examine the influence of chronic exposure to different doses of aluminum trichloride and premedication with verapamil on testicular morphology.- to examine the effect of chronic exposure to different doses of

aluminum trichloride and premedication with verapamil on liver morphology and function.

- to examine the degree of apoptosis after chronic administration of aluminum and premedication with verapamil in testicular and liver tissues using proteins of the Bcl-2 family.

Material and methods: 36 male Sprague Dawley rats were included in the experiment, which were divided into 6 groups and were treated as follows: control (K) with saline, V with verapamil, E1 with 10 mg and E2 with 20 mg AlCl₃. Sixty minutes after premedication with verapamil, E3 received 10 mg and E4 20 mg AlCl₃. After 8 weeks, the animals were sacrificed and blood was taken for analysis of hematological and biochemical parameters and tissues for both pathohistological and aluminum content examinations.

Results. The results of hematological tests are presented (counts of erythrocytes, leukocytes, thrombocytes, relative and absolute leukocyte counts, hemoglobin concentrations, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, iron, ferritin, transferrin, hepcidin, UIBC, TIBC, TSAT activity; aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, amylase, lactate dehydrogenase, creatine kinase and gamma-glutamyl transferase; CRP concentration; aluminum concentration in liver, testis and kidney tissues; pathohistological findings in liver and testis tissues; testicular morphometry and immunohistochemical cytoplasmic expression of Bax, Bid, and BCL-2 in liver and testicular tissues.

Discussion: the results are explained and discussed. The pathogenetic aspects of hematological and biochemical changes caused by aluminum intoxication and the protective effects of premedication with verapamil are discussed, as well as on the accumulation of aluminum in the liver and testicular tissue. The analysis of the pathogenetic aspect of the toxic effect of aluminum through the influence on calcium homeostasis is given and the latest literature data are discussed in comparison.

Conclusion: it has been proven that chronic application of aluminum leads to significant changes in hematological and biochemical parameters with a pronounced dose-dependent character; The changes in biochemical and hematological parameters (microcytic-hypochromic anemia, leukocytosis, thrombocytosis and elevated values of hepcidin and ferritin) have shown a statistically significant improvement with verapamil premedication. Significant deposition of aluminum in the liver, kidney and testicular tissue was proven, as well as that premedication with verapamil led to a statistically significant reduction in the deposition of aluminum in the mentioned tissues. Immunohistochemical staining has showed a high expression of proapoptotic markers Bax and Bid, which is the most pronounced in testicular tissue, and a high degree of apoptosis expressed by proapoptotic markers Bax and Bid in young germ epithelial cells, but also in Leydig cells. These changes have shown to be mitigated in cases of premedication with verapamil and that the possible protective effect of pharmacological blockade of calcium channels by verapamil is indicated.

Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Pathophysiology
Key Words:	Chronic intoxication with aluminum, blockade of voltage-gated calcium channels, verapamil, apoptosis, morphometry
UDC:	616-092;[669.71:615.9(043.3)]
CERIF Classification:	B 530
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Reči iskrene zahvalnosti upućujem:

mom metnoru, doc dr Dijani Stojanović , na pruženoj sigurnoj ruci, poverenju, strpljenju, istrajnosti, uloženom vremenu, požrtvovanju i dobroti;

prof.dr Borisu Đinđiću na ideji, bezrezervnoj podršci i toplom prijateljstvu;

prof. dr Maji Milojković na dobronamernosti, pruženoj prilici i razumevanju;

prof. dr Snežani Živančević Simonović na svesrdnosti, bezgraničnom prijateljstvu i pomoći;

doc. dr Nataši Čolović na korisnim savetima, podršci i pomoći;

doc. dr Jeleni Milenković na spremnosti da pomogne uvek kada je najteže;

prof. dr Ljubinki Veličković i doc. dr Aleksandru Petroviću bez kojih bi bilo nemoguće odraditi i kvalitetno tumačiti patohistološke nalaze;

dr sc. Vladanu Čosiću i osoblju Centra za medicinsku i kliničku biohemiju Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu za pomoć u obradi biohemijskih testova;

nastavnicima, saradnicima i osoblju Instituta za patofiziologiju na predusretljivosti i kolegijalnosti;

osoblju i kolegama Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta na saradnji i drugarstvu;

prof. dr Tanji Jeftović Stojmenov na pomoći i podršci;

naročitu zahvalnost dugujem prof. dr. Stevi Najmanu na beskrajnom poverenju, podršci i prijateljstvu;

i zaposlenima u Odseku za doktorske akademske studije na ljubaznosti i uvek otvorenim vratima.

SADRŽAJ

1.0. UVOD	13
2.0. PREGLED LITERATURE	14
2.1. Hemijske i fizičke osobine aluminijuma	14
2.2. Izvori aluminijuma u prirodi	14
2.3. Istorijat otkrića i etimologija aluminijuma	15
2.4. Proizvodnja i upotreba aluminijuma.....	16
2.5. Ekspozicije toksičnom dejstvu aluminijuma u životnom okruženju	16
2.5.1. Ekspozicija aluminijumu preko vazduha i vode za piće	17
2.5.2. Unos aluminijuma hranom	19
2.5.3. Ekspozicija aluminijumu preko kozmetičkih i farmaceutskih sredstava	22
2.6. Apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija aluminijuma iz organizma	23
2.6.1. Apsorpcija aluminijuma preko digestivnog trakata.....	24
2.6.2. Apsorpcija aluminijuma preko respiratornog trakata	26
2.6.3. Apsorpcija aluminijuma preko kože i parenteralnim putem i njego- va distribucija u organizmu.....	27
2.6.4. Eliminacija aluminijuma iz organizma.....	29
2.7. Patofiziološki aspekti toksičnog delovanja aluminijuma.....	29
2.7.1. Toksični efekti aluminijuma na centralni nervni sistem	30
2.7.2. Toksični efekti aluminijuma na respiratorni sistem	31
2.7.3. Toksični efekti aluminijuma na koštano i hematopoetsko tkivo	32
2.7.4. Toksični efekti aluminijuma na reproduktivni sistem.....	33
2.7.5. Toksični efekti aluminijuma na jetru i kardiovaskularni sistem	35
2.7.6. Toksični efekti aluminijuma na kožu	35
2.8. Patogenetski mehanizmi delovanja aluminijuma	36
2.8.1. Toksično delovanje aluminijuma i oksidativni stres	36
2.8.2. Uticaj aluminijuma na promenu funkcije membrana	37
2.8.3. Aluminijum i poremećaj ćelijske signalizacije.....	38
2.8.4. Promena funkcije enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfata usled dejstva aluminijuma.....	38
2.9. Kalcijumovi kanali.....	39
2.9.1. Farmakološka blokada kalcijumovih kanala verapamilom	40
2.10. Proteini Bcl-2 familije	41

3.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	45
4.0. MATERIJAL I METODE	46
4.1. Dizajn studije i eksperimentalne životinje.....	46
4.2. Hematološke i biohemijske analize	47
4.3. Određivanje koncentracije aluminijuma u uzorcima tkiva	47
4.3.1. Aparatura	48
4.3.2. Reagensi	48
4.3.3. Priprema uzoraka.....	48
4.3.4. Optimizacija ICP-OES instrumenta	48
4.3.5. Efekat matriksa i izbor analitičkih linija	49
4.3.6. <i>Recovery</i> test.....	49
4.3.7. Validacija metode.....	49
4.4. Patohistološka analiza tkiva.....	50
4.4.1. Klasična histološka hematoksilin-eozin metoda bojenja.....	50
4.4.2. Imunohistohemijska Avidin-Biotin Complex (ABC) metoda za detekciju citoplazmatske ekspesije Bax, Bid i Bcl-2.....	51
4.4.3. Morfometrija tkiva	51
4.5. Statističke analize	52
5.0. REZULTATI.....	54
5.1. Osnovne hematološko-biohemijske karakteristike eksperimentalne grupe Sprague Dawley pacova pre i nakon davanja verapamila	54
5.2. Optimizacija operativnih uslova plazme.....	58
5.3. Efekat matrice i izbor analitičkih linija.....	59
5.4. Validacija	60
5.5. Sadržaj aluminijuma u uzorcima tkiva mužjaka Sprague-Dawley pacova.....	60
5.6. Patohistološka i imunohistohemijska analiza tkiva jetre testiranih Sprague-Dawley pacova	66
5.7. Analiza morfometrijskih parametara tkiva testisa pacova Sprague-Dawley	73
5.8. Patohistološka i imunohistohemijska analiza tkiva testisa testiranih Sprague-Dawley pacova	73

6.0. DISKUSIJA	80
6.1. Hematološko-biohemijske i tkivne promene tretiranih životinja pre i nakon administracije verapamila	80
6.2. Patofiziološki mehanizmi mikrocytoze indukovane toksičnim efekom aluminijuma	83
6.3. Morfometrijske i imunohemijske promene testisa tretiranih životinja pre i nakon administracije verapamila	85
6.4. Patogenetski mehanizmi oštećenja testisa indukovanih toksičnim efekom aluminijuma	89
6.5. Patogenetski mehanizmi apoptoze izazvane aluminijum hloridom.....	91
6.6. Promene tkiva jetre tretiranih životinja pre i nakon administracije verapamila i patofiziologija oštećenja hepatocita.....	94
6.7. Patofiziologija protektivnog delovanja blokade kalcijumovih kanala u slučajevima aluminijumske intoksikacije	97
7.0. ZAKLJUČAK	100
8.0. LITERATURA	101
Lista slika.....	125
Lista tabela.....	127
Lista grafikona	128
Lista skraćenica.....	129
Biografija autora	131

1.0. UVOD

Aluminijum (Al) je treći element po zastupljenosti, iza kiseonika i silicijuma, a najzastupljeniji metal u Zemljinoj kori. Zbog svoje velike reaktivnosti u prirodi se nalazi skoro uvek u kombinaciji sa drugim elementima. Aluminijum je tokom geološke istorije bio teško dostupan biološkim sistemima, ali je usled ljudske aktivnosti u poslednjih stotinak godina pokrenut iz svojih ležišta i postao dostupan savremenom čoveku. Upotreba đubriva i pojava kiselih kiša doveli su do zakišeljavanja zemljišta, što je omogućilo rastvorljivost jedinjenja sa aluminijumom, čime je i omogućen i olakšan njegov ulazak u biološke sisteme. Akumulacija aluminijuma u organizmu najčešće se javlja kod osoba sa oslabljenom ekskretornom funkcijom bubrega, kod male dece koja ga unose preko veštačkog mleka na bazi soje i pacijenata koji koriste antacide na aluminijumskoj bazi. Smatra se da je hronična intoksikacija aluminijumom odgovorna za razvoj niza neurodegenerativnih bolesti: deficita pažnje, autizma, amiotrofične lateralne skleroze, demencije, Alzheimerove bolesti i parkinsonizma.

Dokazano je da ne postoji sistem organa na koji aluminijum ne ispoljava toksično delovanje. Reproductivni, endokrini, gastrointestinalni, respiratorni i urinarni sistem takođe predstavljaju mesta njegove akumulacije, a samim tim i remećenja njihove funkcije usled razvoja toksičnosti. Ilustrativan je podatak da je kod radnika koji rade u primarnoj proizvodnji ovog metala ili sekundarnoj industrijskoj proizvodnji zabeležen porast učestalosti plućne fibroze, plućnog alveolitisa i alveolarne proteinoze, astme i hronične upale pluća.

Zbog masovnog korišćenja i sve većeg prisustva u biološkom sistemu nameće se potreba za pronalaženjem odgovora na pitanja koji su mehanizmi toksičnog delovanja aluminijuma na organizam. Rezultati kliničkih i eksperimentalnih studija ukazuju da postoji više patogenetskih mehanizama kojima aluminijum ispoljava toksično delovanje na ćelije. Pored oksidativnog stresa, poremećaja funkcije membrana, promene ili inhibicije funkcije enzima, navodi se i poremećaj unutarćelijske signalizacije kao važan patogenetski faktor.

Utvrđeno je da joni aluminijuma mogu modifikovali različite signalne puteve i funkcije sekundarnih glasnika, koji su uključeni u esencijalne procese kao što su rast ćelija, diferencijacija i apoptoza. Postoje dokazi da poremećaj regulacije homeostaze Ca^{2+} predstavlja snažan patogenetski mehanizam u razvoju aluminijumske toksičnosti i da se blokiranjem njegovim kanala može ublažiti i/ili eliminisati efekat hronične ekspozicije aluminijumu.

2.0. PREGLED LITERATURE

2.1. Hemijske i fizičke osobine aluminijuma

Aluminijum (Al) je element čiji je hemijski broj 13 i pripada grupi bora u periodnom sistemu elemenata. Al je laki metal, srebrno-bele boje, čija je relativna atomska masa 26,98, a specifična gustina $2,7\text{g/cm}^3$. Tačka topljenja mu je 660°C , a tačka ključanja $2\ 519\ 001^\circ\text{C}$ (1). Posедуje veliku električnu i toplotnu provodljivost. Aluminijum je mek, lako kovan metal, podesan za izvlačenje i presovanje. Hemijski čist izuzetno se retko nalazi u prirodi. Veoma je reaktivan i gradi hemijski stabilna jedinjenja. Pri kontaktu sa kiseonikom, vodom ili drugim oksidansima, gradi na površini zaštitni film aluminijum oksida (Al_2O_3) koji je zahvaljujući nerastvorljivosti u vodi veoma otporan na koroziju. Međutim, ovaj pasivizirajući sloj aluminijum oksida rastvara se u mineralnim kiselinama i jakim bazama (NaOH, KOH). Mogu da ga rastvore hlorovodonična i zagrejana sumporna kiselina. Prilikom rastvaranja oksidnog filma u alkalnim rastvorima nastaju vodonik i rastvorljivi aluminati alkalnih metala. Nakon rastvaranja oksidnog sloja Al je izložen daljim reakcijama. Aluminijum hlorid, nitrat i sulfat rastvorljivi su u vodi, a halogenidi i hidridi Al burno reguju sa vodom.

Na povišenim temperaturama (iznad 180°C) aluminijum reaguje sa vodom stvarajući $\text{Al}(\text{OH})_3$ i H_2 . U kontaktu Al sa mnogim metalnim oksidima nastaju Al_2O_3 i odgovarajući metal. Fina prašina Al je zapaljiva i može izazvati eksploziju. Pri njenom sagorevanju oslobađa se velika količina energije, a temperatura plamena je i do 3000°C (2,3).

2.2. Izvori aluminijuma u prirodi

Aluminijum predstavlja najzastupljeniji metal u Zemljinoj kori (7,45%), a treći po zastupljenosti, odmah nakon silicijuma i kiseonika, Zbog toga što je veoma reaktivan, Al se nalazi u prirodi. u obliku brojnih jedinjenja. Do 2010. godine otkriveno je 1.156 minerala koji ga sadrže (4,5). Najzastupljeniji su silikatni minerali i minerali iz grupe oksida i hidroksida (boksit, hidrargilit, dijaspor, bemit, korund, spineli i dr.). Minerali aluminijuma koji su produkti raspadanja alumosilikatnih minerala (feldspata, liskuna i drugih) nalaze se u sastavu glina. Za industrijsku ekstrakciju ovog metala najčešće se koristi ruda boksit. Najveći broj poznatih ležišta boksita nalazi se na teritoriji Australije, Afrike, Indije, Južne Amerike.

Najveći proizvođači aluminijuma u svetu su: Kina, Rusija, Australija, Ujedinjeni Arapski Emirati, Sjedinjene Američke Države i Norveška (6).

Poznata su 22 izotopa aluminijuma (masenih brojeva od ^{22}Al do ^{43}Al) i 4 izomera. Prirodnim putem nastaju samo: ^{27}Al i ^{26}Al . Jedini stabilni izotop Al je ^{27}Al . Radioaktivni izotop ^{26}Al ima vreme poluraspada 716.000 godina i može se naći u prirodi. Svi ostali radioaktivni izotopi Al imaju vreme poluraspada ispod 7 minuta, a većina njih čak ispod jedne sekunde. ^{26}Al nastaje iz argona u Zemljinoj atmosferi putem spalacije uzrokovane protonima iz kosmičkih zraka. Odnos između ^{26}Al i ^{10}Be koristi se za proučavanje uloge, pomeranja, kretanja, skladištenja nanosa i erozije tokom vremena. Ima praktičnu primenu u određivanju starosti okeanskih sedimenata, nalazišta mangana, glečerskog leda, kvarca u stenama i meteorita (7,8). Aluminijum-oksidi može da se nađe u prirodi u kristalnom obliku. Korund je najčešći kristalni oblik aluminijum-oksida. Drago kamenje visokog kvaliteta, rubini i safiri, su varijeteti korunda. Rubin ima karakterističnu tamnocrvenu boju koja potiče od tragova hroma u kristalu. Safiri mogu biti različito obojeni zavisno od toga da li sadrže primese gvožđa, kobalta ili titanijuma (9,10).

2.3. Istorijat otkrića i etimologija aluminijuma

Aluminijum spada u elemente koji su otkriveni u prvoj polovini devetnaestog veka. Antoine Lavoisier izneo je 1787. godine pretpostavku da je alumina oksid metala koji još nije otkriven. Humphry Davy, koji je bezuspešno pokušavao da izoluje ovaj element, predložio je 1808 da ga nazovu alumium, ali se naknadno složio da ime bude promenjeno u aluminum. Pošto je nešto kasnije donesena odluka da se većini hemijskih elemenata daju imena koja se završavaju sa nastavkom -ium, došlo se do naziva aluminijum. Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (*International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC) je 1990. godine usvojila aluminijum za zvaničan naziv. Pošto se termin aluminum uporno i dalje koristio u Sjedinjenim Američkim Državama IUPAC ga je 1993. godine prihvatio za drugu važeću varijantu imena ovog metala (11). Inače, naziv aluminijuma potiče od latinske reči *alumen* što znači stipsa [kalijum aluminijum sulfat, $\text{K}_2\text{Al}_6(\text{OH})_{12}(\text{SO}_4)_4$]. Alumen su stari Grci i Rimljani koristili kao adstringentno sredstvo u medicini i kao sredstvo za bojenje.

Hans Christian Ørsted je prvi uspeo da izoluje aluminijum 1825. godine, koji je u to vreme bio veoma cenjen metal, vredniji od zlata i platine. Zabeleženo je da je imperator Napoleon u želji da impresionira goste koristio escajg od ovog metala (12).

2.4. Proizvodnja i upotreba aluminijuma

Charles Hall i Paul Heroult su 1886. godine istovremeno i nezavisno jedan od drugog razvili postupak za dobijanje aluminijuma elektrolizom, po kojima je ovaj način ekstrakcije dobio naziv. Ekstrakcija Al pomoću Hall-Heroult-ovog postupka iz aluminijum oksida zahtevala je veliki utrošak električne energije, što je u to vreme ograničavalo proizvodnju. Karl Josef Bayer, austrijski inženjer, razvio je 1886. godine hemijski postupak za ekstrakciju glinice iz boksita (12). Danas se za proizvodnju Al koriste oba postupka: Bayer-ov i Hall-Heroult-ov. Pored toga koristi se i komercijalna reciklaža Al (13,14). Tokom 2020. godine proizvedeno je u svetu oko 65295000 metričkih tona aluminijuma u okviru primarne proizvodnje, ne računajući reciklažu (15).

Aluminijum i njegova hemijska jedinjenja imaju široku upotrebu. Najviše se koriste: aluminijum hlorid, aluminijum hidroksid (aluminijum oksid trihidrat), aluminijum nitrat, aluminijum fosfat, aluminijum sulfat (stipsa), aluminijum kalijum (kalijumova stipsa), aluminijum amonijum sulfat (amonijumova stipsa) i aluminijum silikat. Aluminijum se najviše koristi u metalo-prerađivačkoj industriji, jer sa titanijumom, bakrom, magnezijumom, cinkom, berilijumom i drugim elementima gradi legure koje su lagane i poseduju veliku mehaničku čvrstinu i tvrdoću (16). Legure aluminijuma se koriste kao građevinski materijal (prozori, vrata, ograde); u proizvodnji transportnih sredstava (automobila, kamiona, vagona, brodova, aviona, svemirskih letilica itd.) za proizvodnju aparata za domaćinstvo, sudova za kuvanje; za pakovanje hrane (konzerve, posude, folije); u elektroindustriji, (proizvodnja elektrotehnike i različitih kablova); za delove pametnih telefona, tableta, laptopova i ravnih TV ekrana. Mineralna jedinjenja aluminijuma prirodnog porekla (beonit i zeolit) koriste se za prečišćavanje vode za piće, kao koagulansi, u cilju smanjenja nivoa organskih materija, boje, oblačnosti i mikroorganizama. Takođe se upotrebljavaju za rafiniranje šećera, u proizvodnji piva i industriji papira (2,3,17,18). Pojedini aditivi koji se dodaju u hranu (emulgatori, jestive boje i prašak za pecivo) takođe ga sadrže (19). Jedinjenja aluminijuma se koriste u farmaciji, medicini (antacidi, adstringensi), kozmetici (zubne paste, dezodoransi) i stomatologiji (izrada zubnih krunica i proteza) (2,19).

2.5. Ekspozicije toksičnom dejstvu aluminijuma u životnom okruženju

Aluminijum može da dospe u ljudski organizam preko vazduha, pijaće vode, hrane, upotrebom farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Kontaminacija vazduha, vode i zemljišta aluminijumom nastaje dvojako: usled erozije i preko antropogenih izvora. Erozijska

podrazumeva odronjavanje i usitnjavanje stena i minerala koji sadrže aluminijum usled delovanja kiše, snega, mraza, temperaturnih razlika, vetra i tekućih voda. Pošto su njegova jedinjenja koja se nalaze u sastavu Zemljine kore, kao što su aluminijum oksid, aluminijum hidroksid i kalijum aluminijum sulfat neratvorljiva u vodi kada je pH neutralan, ovaj metal je tokom evolucije bio nedostupan živom svetu. Koncentracija rastvorenog Al^{3+} u površinskim i podzemnim vodama je u prošlosti bila mala. Kisele kiše koje nastaju emisijom u atmosferu supstanci koje se stvaraju ljudskom aktivnošću (sumpor dioksid, azotni oksidi, upotreba zakiseljujućih đubriva) menjaju pH zemljišta. Koncentraciju rastvorljivog Al^{3+} povećava se u zemljištu i vodi (20-22). Na taj način joni aluminijuma pokreću se iz mineralnih ležišta u kojima su bili skladišteni milijardama godina u obliku hidroksi-aluminosilikata. Aluminijum je postao dostupan biljkama, životinjama i ljudima. Krajem dvadesetog i početkom dvadeset i prvog veka povećava se količina biološki reaktivnog aluminijuma u životnoj sredini i omogućuje njegovo delovanje na biosferu (20-22).

Angažovanje moderne tehnologije za vađenje aluminijuma iz njegovih biološki inertnih ruda boksita i kriolita je takođe odgovorno za njegov povećan ulazak u biološki sistem kao i široka upotreba ovog metala. Male su šanse da se aluminijum koji je ušao u biološki ciklus, brzo vrati u litosferski ciklus (23-25). Glavne karakteristike njegovog biogeochemijskog ciklusa uključuju ispiranje aluminijuma iz geohemijskih formacija, dospevanje čestica jedinjenja aluminijuma u vodenu sredinu, njihovu adsorpciju na čestice tla ili sedimenta i vlažno i suvo taloženje iz vazduha u zemlju i površinske vode (26).

2.5.1. Ekspozicija aluminijumu preko vazduha i vode za piće

Čestice ili kapljice jedinjenja aluminijuma koje su nalaze u vazduhu inhalacijom dospevaju u respiratorni trakt. One su prisutne i u nezagađenim područjima planete, poput Antarktika. Udisanjem čistog vazduha u kome se nalazi oko 100 ng Al po m^3 unesemo preko respiratornog trakta približno 1,4 μg Al dnevno (27). Najveći izvor čestica Al u vazduhu je prašina koja potiče iz tla i stena. Prašina koja sadrži Al može dospeti u atmosferu i usled vulkanskih erupcija (28). Ljudske aktivnosti, poput rudarstva, industrije i poljoprivrede, doprinose stvaranju prašine koju raznose vetrovi (29,30). U mnogim industrijskim područjima, kao na primer u nekim industrijskim centrima u Kini, ekspozicija Al može biti i hiljadu puta veća i dostići 1,4 mg dnevno. Glavni antropogeni izvori čestica koje sadrže Al su: sagorevanje uglja, proizvodnja i obrada Al, livnice gvožđa i čelika, rafinerije mesinga i bronz, emisija motornih vozila i druge industrijske aktivnosti. Na izloženost Al preko

respiratornog trakta takođe mogu značajno uticati aktivnosti poput pušenja cigareta i kanabisa upotrebe kokaina i heroina (31-34). Redovna upotreba antiperspiranata u obliku aerosola koji sadrže aluminijum može takođe povećati ekspoziciju aluminijumu preko respiratornog trakta (25).

Ljudi i životinje mogu biti izloženi unosu aluminijuma u organizam i preko vode za piće. Ovaj metal dospeva u vodu zahvaljujući vremenskoj eroziji, ljudskim aktivnostima (industrijskim, poljoprivrednim) i prilikom prečišćavanja vode. Aluminijum je neizostavno prisutan u svim prirodnim vodama zahvaljujući vremenskoj eroziji stena i minerala koji ga sadrže i sledstvenoj mobilizaciji iz tla u vodeni sistem. Mobilizacija aluminijuma je često sezonske prirode i povezana je sa snižavanjem pH, tačnije zakiseljavanjem koje se javlja tokom prolećnog topljenja snega ili može biti povezano sa erozijom zbog oluja i nevremena. Koncentracija Al u površinskim vodama može se povećati direktno ili posredno usled ljudskih aktivnosti preko industrijskih i komunalnih otpadnih voda, površinskog ispiranja zemljišta, proceđivanjem podzemnih voda i vlažnog i suvog atmosferskog taloženja. Kisela drenaža iz rudnika i kisele kiše mogu prouzrokovati povećanje sadržaja rastvorenog Al u okolnim vodenim tokovima (25,26). Upotreba jedinjenja Al kao koagulanata, sredstava za zgrušavanje, u tretmanu vode, može povećati njegov sadržaj u vodi za piće (35). Aluminijum u vodi može biti prisutan u obliku organskih i neorganska jedinjenja. Važan faktor koji utiče na njegovu rastvorljivost je pH vrednost. Koncentracija rastvorenog Al se povećava pri višim ili nižim vrednostima pH (36,37).

Količina aluminijuma u prirodnim vodama varira od 0,0001 do 1 mg/dm³, ali u kiselim vodama (pH <5) koncentracija Al može preći čak 100 mg/dm³. Jedinjenja Al imaju slabu rastvorljivost pri pH od 6 do 8. Zahvaljujući tome u površinskim i podzemnim vodama koncentracije Al su vrlo male od 60 do 300 µg/m³. Opasan je za žive organizme, posebno u kiselom, ali i alkalnom okruženju, jer se javlja u jonizovanom obliku, u kome se lako apsorbuje. U neutralnom okruženju, jedinjenja Al su nerastvorljiva i izlučuju se iz tela (35).

Agencija za zaštitu životne sredine (*The Environmental Protection Agency – EPA*) preporučila je sekundarni maksimalni nivo zagađivača (*Secondary Maximum Contaminant Level-SMCL*) od 0,05-0,2 mg/dm³ za Al u vodi za piće 2017. godine (38). Svetska zdravstvena organizacija zahtevala je da koncentracija Al koji zaostaje u vodi za piće mora biti niža od 0,2 mg/m³ (39). Rastvorljivost, biorasploživost i toksičnost Al koji je prisutan u vodi zavisi od osobina jedinjenja koje se koristi kao koagulans za prečišćavanje vode (35). U Republici Srbiji maksimalna dopuštena koncentracija Al u flaširanoj prirodnoj vodi za piće je

$\leq 0,05$ mg/l, a dozvoljena koncentracija nakon korišćenja koagulacionih i flokulacionih sredstava u vodi za piće je $\leq 0,2$ mg/l (40).

2.5.2. Unos aluminijuma hranom

Smatra se da je oralni put glavni način unosa Al u organizam, jer se nalazi prirodno u svežim, neprerađenim namirnicama. On takođe dospeva u hranu prilikom čuvanja hrane u aluminijumskim posudama ili foliji, prilikom pripremanja hrane (kuvanjem, pečenjem i grilovanjem) i dodavanjem aditiva koji sadrže Al (41). Zajednički ekspertski komitet za aditive hrane Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija i Svetske zdravstvene organizacije [*The Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA)*] izvršio je toksikološku procenu akumulacije Al u organizmu na osnovu studija na životinjama. Komitet je ustanovio vrednost za privremeno podnošljivi nedeljni unos [*Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI)*] za Al od 2 mg/kg telesne mase nedeljno 2011. godine (42).

Evropska agencija za sigurnost hrane (*European Food Safety Authority - EFSA*) ustanovila je 2008. strožiji kriterijum za nedeljni unos aluminijuma sa gornjom granicom od 1 mg/kg telesne mase za sve starosne grupe (19). U skladu sa tim, odrasla osoba teška 70 kg može da konzumira 70,0 mg Al nedeljno tokom života, a dete težine 15 kg sme da unese do 15,0 mg nedeljno. Primarni sadržaj Al je njegov prirodni sadržaj u hrani, koji je neizbežan. On nastaje unošenjem Al iz prirodnog geološkog okruženja tokom rasta biljaka i životinja. Sekundarni sadržaj podrazumeva količinu aluminijuma koja dospe u namirnice biljnog i životinjskog porekla ljudskom aktivnošću, kontaminacijom zbog upotrebe đubriva, preko vazduha, vode i veterinarskih lekova. Tercijarni izvori su aditivi hrane, aluminijumsko posuđe i ambalaža koja direktno dolazi u kontakt sa hranom (43).

Primarni sadržaj Al u hrani biljnog i životinjskog porekla varira. Sadržaj Al u biljkama odražava njegov sadržaj u zemljištu i vodi. Većina biljaka sadrži manje od 5 mg/kg Al, a biljke koje rastu na kiselom tlu akumuliraju veće količine. U biljke koje sadrže više od 10mg/kg Al spadaju: lišće čaja, kakao, kafa, lisnato povrće, krompir, određeno suptropsko voće, kao i začinske biljke. Lišće čaja može sadržati čak 945 mg/kg aluminijuma. Začini takođe spadaju u grupu namirnica koje mogu da sadrže velike koncentracije. Naročito velike koncentracije pronađene su u cimetu, senfu, origanu i paprici (43).

Vršena su ispitivanja sadržaja Al u različitim grupama prehrambenih proizvoda. U studiji u kojoj je ispitan sadržaj aluminijuma u Nemačkoj, uglavnom u namirnicama biljnog

porekla i pićima (1431 proizvoda), utvrđene su koncentracije koje se kreću od 0,4 do 737 mg/kg prehrambenog proizvoda. Utvrđeno je da 77,8% namirnica ima sadržaj aluminijuma manji od 10 mg/kg, 17,5% sadrži od 10-100 mg/kg i svega 4,6% više od 100 mg/kg. Srednji sadržaj aluminijuma od 5 do 10 mg/kg pronađen je u hlebu, kolačima, pecivima, povrću i to: pečurkama, spanaću, rotkvicama, zelenoj salati (45). Koncentracija Al koja se prirodno javlja u hrani životinjskog porekla pokazatelj je njegovog sadržaja u stočnoj hrani i sklonosti tkiva i organa da ga akumuliraju. Mlečni proizvodi, kobasice, iznutrice, morski plodovi sadrže 5,00–10,0 mg/kg aluminijuma (44,45).

Ispitivanjem sadržaja u mlečnim proizvodima nađena je zanemarljiva količina ovog metala u neprerađenom mleku, ali njegova koncentracija u mleku iz prodavnice, siru i mleku u prahu prekoračuje dozvoljene granice. Koncentracija aluminijuma u mleku koje se čuva u aluminijumskim posudama i mlečnim proizvodima koji su zapakovani u aluminijumsku foliju prevazilazi privremeno prihvatljive dozvoljene granice (*provisional acceptable permissible limits - PAPLs*) što predstavlja opasnost po zdravlje. Kante za otkup mleka bi trebalo da budu izrađene od nerđajućeg čelika, a ne od aluminijuma, kao ni topljeni sir. Kontaminacija mlečnih proizvoda aluminijumom mnogo je veća tokom skladištenja, nego u toku ključanja. Mleko treba čuvati u nerđajućim čeličnim ili staklenim posudama u frižideru (46).

Tercijarni izvori aluminijuma u hrani su posuđe, ambalaža i folije čija upotreba može povećati količinu aluminijuma u hrani. Migracija aluminijuma iz posuđa i ambalaže odvija se i prilikom čuvanja hrane a povećava se sa kiselošću hrane i dužim kontaktom. Prelazak Al u hranu prilikom pripremanja povećava se sa porastom temperature, dužinom kuvanja, kiselošću i prisustvom drugih supstanci, poput organskih kiselina i soli. Dokazano je da prelazak aluminijuma u hranu, kada se hrana priprema umotana u aluminijumsku foliju ili u aluminijumskom posuđu nije zanemarljiv. Konzumacija ovako pripremljene hrane, zajedno sa drugim namirnicama koje ga prirodno sadrže, kao na primer neke vrste povrća, može dovesti do unošenja nedeljne doze koja se približava podnošljivom nedeljnom unosu (45,47,48). Utvrđeno je da se sadržaj aluminijuma povećava u kiselim napitcima koji su pakovani u aluminijumske limenke. Dobar primer za ovu tvrdnju je činjenica da piće iz limenke ima 5-7 puta veći sadržaj aluminijuma nego isto piće pakovano u staklenoj ambalaži (49). Kada je u pitanju dete težine 15 kg, pijenje čaja iz aluminijumske bočice može premašiti dozvoljeni nedeljni unos (145%) (50,51). Hranu ne treba prekrivati aluminijumskom folijom kada je istovremeno u kontaktu sa metalom ili legurama sa višim standardnim potencijalom elektrode. Odnosno, kada je hrana u kontaktu sa folijom a nalazi se u posudi od čelika ili srebra, dolazi do većeg prelaska Al u hranu (52).

Aditivi koji se dodaju hrani koji sadrže aluminijum pripadaju takođe tercijarnim, antropogenim izvorima i mogu znatno da utiču na njegovu koncentraciju u namirnicama. Razna jedinjenja Al odobrena su kao aditivi u Evropskoj uniji. Upotrebljavaju se kao sredstva za bojenje, sredstva za učvršćivanje, sredstva protiv zgrudnjavanja i sredstva za dizanje testa. Evropska unija reguliše upotrebu aditiva za hranu u svom prostoru odgovarajućim propisima [(EZ) br. 1333/2008 (53). Dozvoljene maksimalne količine aditiva koji sadrže Al ovim propisima su relativno visoke. Da bi se smanjila izloženost Al određene su odgovarajuće maksimalne dozvoljene količine aditiva, a za pojedine aditive ograničena je upotreba odnosno dozvoljena je njihova upotreba samo u pojedinim namirnicama (Uredba br. 380/2012) (53,54). Ukupna izloženost aluminijumu oralnim putem procenjena je na osnovu prehrambenih studija (Holandija, Mađarska, Nemačka, Švedska, Norveška i Italija) i studija potrošačkih korporacija i ukupne dijete (Velika Britanija, Finska i Francuska). Prosečna ekspozicija odraslih osoba iznosi 0,2-1,5 mg/kg telesne mase nedeljno, dok je maksimalna izloženost dece i mladih bila između 0,7 i 2,3 mg/kg telesne mase na sedmičnom nivou. To je između 14 i 105 mg aluminijuma nedeljno za odraslu osobu od 70 kg i od 21 do 69 mg nedeljno za dete od 30 kg. Ove procene pokazuju da deo ljudske populacije uobičajenom ishranom može postići dozvoljeni nedeljni unos Al (19). Deca imaju proporcionalno veći unos hrane u odnosu na telesnu masu od odraslih, što doprinosi povećanju njihove potencijalne izloženosti.

Rađena su istraživanja sadržaja aluminijuma u dečijoj hrani. Maksimalno dozvoljena granica u adaptiranoj mlečnoj hrani iznosi 0,4 mg/kg (55). Procenjeno je da je potencijalna izloženost dece koja sisaju manja od 0,07 mg/kg telesne mase nedeljno. Dojenju treba dati prednost, jer je sadržaj aluminijuma u majčinom mleku niži nego u tzv. adaptiranom mleku, tačnije različitim adaptiranim mlečnim formulama za bebe. Sadržaj Al u gotovim formulama kreće se od 33,7 do 111,0 mg/l. Sadržaj aluminijuma u formulama u prahu kreće se od 0,27 do 3,27 mg/g. Procenjeno je da je potencijalna prosečna izloženost aluminijumu tromesečne bebe hranjene formulom na bazi mleka 0,6 mg/kg telesne mase nedeljno, a za formule na bazi soje 0,75 mg/kg telesne mase nedeljno. U pojedinim formulama (kako na bazi mleka, tako i na bazi soje) koncentracija Al bila oko 4 puta je veća od srednjih koncentracija (19,56). Alarmantno je da je najveća kontaminacija Al registrovana u hrani namenjenoj deci koja treba da povećaju telesnu masu ili pate od alergija i raznih vrsta netolerancije. Međutim, u nekim formulama za dojenčad izmerene su najniže koncentracije Al, što pokazuje da je kontaminaciju adaptiranih mleka i hrane za odojčad moguće izbeći (57,19).

2.5.3. Ekspozicija aluminijumu preko kozmetičkih i farmaceutskih sredstava

Dodatni, potencijalno značajni izvori ekspozicije Al, su kozmetika i proizvodi za ličnu negu kao što su antiperspiranti, ruževi za usne, paste za zube i kreme za sunčanje, iz kojih se aluminijum može apsorbirati oralno ili kroz kožu (58). Veliki broj različitih jedinjenja koja sadrže Al koristi se u kozmetici, uključujući proste neorganske i organske soli, hlorohidrate, minerale, gline, soli ugljenih hidrata i masnih kiselina. Soli aluminijuma u antiperspirantima (hlorohidrati) formiraju nerastvorljive čepove polimernog gela od aluminijum hidroksida unutar kanala znojnih žlezdi i na taj način privremeno sprečavaju znojenje. Ruževi za usne i paste za zube uglavnom sadrže u vodi nerastvorljive sastojke aluminijuma, poput aluminijumskih koloidnih boja i nerastvorljivih minerala. Aluminijumske koloidne boje uglavnom se koriste u ruževima (19). Sadržaj Al obično se kreće od 0,01 do 10%, ali može da dostigne i 18% (19). U pastama za zube koriste se nerastvorljivi minerali aluminijuma koji deluju kao blagi abrazivi i poliranjem daju sjaj gleđi. Paste za zube takođe mogu da sadrže aluminijumske koloidne boje i pigmente (58).

U Norveškoj je rađena studija kojom je procenjen doprinos kozmetičkih sredstava sistemskoj ekspoziciji aluminijumu. Veliko prekoračenje (15-50 puta) zabeleženo je kod potrošača koji koriste više kozmetičkih proizvoda (59). Procenom rizika došlo se do zaključka da kozmetički proizvodi, kada se redovno koriste (posebno antiperspiranti kod osoba sa oštećenom kožom), znatno više od načina ishrane mogu da doprinesu ukupnoj sistemskoj izloženosti aluminijumu.

Aluminijum se nalazi u sastavu farmaceutskih proizvoda: preparata za parenteralnu ishranu, rastvora za dijalizu, sredstava za vezivanje fosfata na bazi aluminijuma, vakcina, antacida i puferovanih analgetika (60,61). Prisutan je u svim preparatima za parenteralnu ishranu. Intravenska aplikacija jedinjenja za parenteralnu ishranu koja sadrže velike koncentracije Al nosi rizik od toksičnog delovanja, jer se zaobilazi zaštitna gastrointestinalna barijera. Sa porastom dužine vremenskog perioda primene parenteralne ishrane, raste unos Al i opasnost od intoksikacije. Štetnom delovanju ove terapije posebno su podložna prevremeno rođena deca kod kojih nisu dovoljno razvijene hematoencefalna barijera i ekskretorna funkcija bubrega. Na zahtev američke Agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration-FDA*) 2004. godine uvedeno je ograničenje sadržaja Al u rastvorima za parenteralnu ishranu na manje od 25 $\mu\text{g/l}$, uz obavezno upozorenje u kome se navodi da kod pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega, infuzija rastvora sa više od 5 $\mu\text{g/kg}$ Al dnevno može toksično delovati na centralni nervni sistem, hematopoetski sistem i kosti (62).

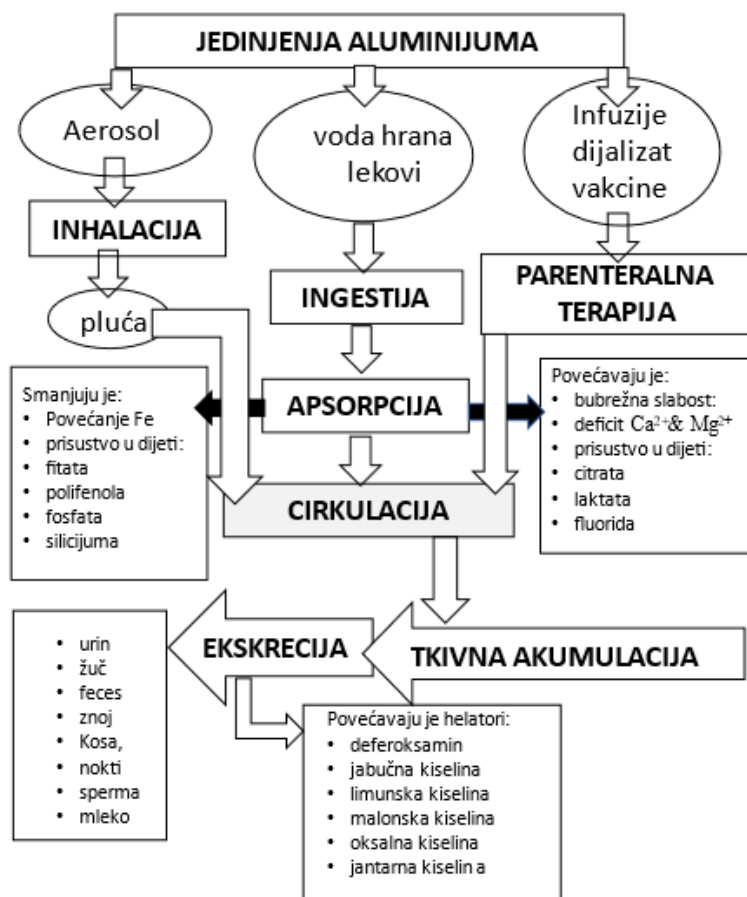
Zvanična farmakopeja zahteva strogu kontrolu sadržaja Al^{3+} u komercijalnim rastvorima za dijalizu i on mora biti manji od $10 \mu g/l$. Zahvaljujući kontrolisanju sadržaja Al u dijaliznoj tečnosti, učestalost povećane koncentracije aluminijuma u krvi pacijenata izuzetno je niska. Zbog potencijalne toksičnosti izbegava se upotreba jedinjenja koja sadrže Al u tretmanu bolesnika sa bubrežnom slabošću (63,64). Prema vodiču kliničke prakse koji je izdalo Internacionalno društvo nefrologa sredstava za vezivanje fosfata na bazi Al ne treba upotrebljavati duže od 4 nedelje (65,66). Pacijenti koji koriste sredstva za vezivanje fosfata na bazi Al, ne smeju unositi citrate oralno, zbog potencijalne opasnosti od intoksikacije (67).

Aluminijum je dominantan adjuvans koji se koristi u većini vakcina namenjenih ljudima, jer adjuvansi koji ga sadrže imaju minimalne štetne efekte i efikasni su u stvaranju antitela. U SAD sadržaj aluminijuma u vakcinama ograničen je Zakonom o saveznim propisima na $1,25 \text{ mg}$ po dozi. Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (*Center for Disease Control-CDC*) daje preporuku da je ukupna količina aplikovanog Al preko vakcina, ispod minimalne količine za koju je utvrdila Agencija za registar toksičnih supstanci i bolesti da predstavlja rizik. Agencija za lekove i medicinska sredstva (ALIMS) Republike Srbije, formira svoje preporuke u odnosu na regulative i vodiče FDA i CDC (62).

Antacidi koji se nalaze u slobodnoj prodaji u kvantitativnom smislu su najveći potencijalni izvor izloženosti aluminijumu (60). Uobičajena terapijska dnevna doza antacida sadrži 5 g aluminijum hidroksida, što je nekoliko stotina puta veća količina aluminijuma od one koja se normalno unosi hranom. Istovremeno uzimanje antacida koji sadrži aluminijum hidroksid i citrata oralnim putem, može da izazove akutnu intoksikaciju Al, koja se klinički manifestuje brzim razvojem progresivne encefalopatije. U uputstvu za lek farmaceutskih proizvoda koji sadrže Al pacijentima treba pružiti informacije o potencijalnoj toksičnosti posebno treba naglasiti mogućnost povećane apsorpcije Al prilikom istovremene upotrebe pića koja sadrže citrate i opasnost od takve upotrebe tokom trudnoće (60).

2.6. Apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija aluminijuma iz organizma

Apsorpcija aluminijuma odvija se preko digestivnog trakta, respiratornog sistema, preko kože i parenteralno.



Slika 1. Faktori koji dovode do akumulacije aluminijuma i nastanka toksikoze

Modifikovano od Igbokwe IO et al. (41)

2.6.1. Apsorpcija aluminijuma preko digestivnog trakata

Glavni način unošenja Al u organizam kod ljudi i životinja je preko digestivnog trakta. Prosečna oralna apsorpcija aluminijuma iz hrane (0,1%) manja je od njegove apsorpcije iz vode (0,3%), što se objašnjava njegovim vezivanjem sa ligandima iz hrane čime se onemogućava njegova apsorpcija (19,68). Apsorpcija preko digestivnog trakta varira u zavisnosti od brojnih faktora kao što su: unesena količina i hemijske osobine jedinjenja sa aluminijumom, pH, statusa gvožđa i kalcijuma, individualnih osobina eksponirane osobe (starost, prisustvo hroničnih oboljenja i sadržaj želuca). Procenat apsorpcije aluminijuma smanjuje se sa povećanjem količine metala (10 do 100 puta je veći procenat apsorpcije kada su u pitanju male količine Al prisutne u okruženju (5 mg), nego kada se radi o velikim terapijskim dozama aluminijuma (1-3 g dnevno u obliku antacida), ali ovaj fenomen ne štiti od intoksikacije (69). Apsorpcija varira i do 10 puta, zavisno od hemijskog oblika jedinjenja sa aluminijumom, a mesto apsorpcije zavisi u velikoj meri od pH. Dugo je smatrano da se

najveći deo apsorpcije Al odvija u kiseloj sredini proksimalnog dvanaestopalačnog creva ili želuca, a da ne postoji ili je minimalna apsorpcija u ostatku gastrointestinalnog trakta. Kasnije je uočeno da svi segmenti tankog creva imaju potencijal za apsorpciju Al, u zavisnosti od preovladavajućih uslova, uprkos potencijalu za hidroksipolimerizaciju Al pri crevnom pH. Tanko crevo i debelo crevo apsorbuju Al pasivno i paracelularno, što nije slučaj sa želucom. Smatra se da apsorpcija Al koja se beleži pretežno u proksimalnom delu digestivnog trakta *in vivo* odražava proksimalnu apsorpciju dijetalnih sastojaka (npr. citrata) koji pojačavaju propustljivost sluzokože za metal (69).

Što se tiče individualnih osobina eksponiranih osoba, treba istaći da je starost veoma važan determinišući faktor kada je u pitanju apsorpcija. Propustljivost creva je povećana u neonatalnom periodu i to može uticati na povećanu apsorpciju Al kod novorođenčadi (70). Propustljivost creva za aluminijum povećana je i kod starijih osoba u odnosu na mlađe (71). Na stepen apsorpcije Al mogu da utiču i neke bolesti, jer je značajno povećana apsorpcija Al kod pacijenata obolelih od Alzheimerera kao i kod obolelih od Down sindroma (72,73).

Apsorpcija Al je dvofazni proces. Najpre dolazi do adsorpcije jona Al^{3+} na nerastvorljivu sluz i do taloženja u obliku soli, čime se ograničava neto apsorpcija metala, a zatim dolazi do sporog otpuštanje metala u krv. Zbog navedene interakcije hemijski oblik Al koji se absorbuje retko je onaj isti hemijski oblik u kome se Al unese u organizam. Iz tog razloga apsorpcija više zavisi od vrste hemijskog jedinjenja Al nego od njegove koncentracije (69). Ingestija Al sa hranom koja sadrži ligande može recipročno uticati na gastrointestinalnu apsorpciju oba. Među ligandima koji pojačavaju apsorpciju Al najčešće se navode citrati, laktati i fluoride (58), a efekat citrata posledica je stvaranja neutralnih aluminijum citrata pri pH od 1 do 4. Međutim, utvrđeno je da citrat uglavnom deluje u proksimalnom delu creva, stvarajući komplekse sa slobodnim endogenim Ca^{2+} jonima koji su postavljeni uz bazolateralnu membranu crevnih ćelija, što olakšava "curenje", odnosno paracelularnu apsorpciju jona Al^{3+} . Apsorpciju mogu da olakšaju i drugi ligandi koji se nalaze u hrani i piću: askorbat, glukonat, laktat, malat, oksalat, sukcinat i tartrat. Ovi liganadi imaju sposobnost da povise pH precipitata jona Al^{3+} sa oko 4,5 na više od 8 *in vitro*. Ligandi mogu i da spreče apsorpciju Al. Prisustvo silicijuma, fosfata, fitata, polifenola i povećan nivo gvožđa značajno smanjuju apsorpciju (58). Sposobnost fosfata da izazovu taloženje Al u obliku soli ($AlPO_4$) koristi se u oralnim lekovima za kontrolu fosfatemije kod pacijenata koji imaju uremiju. Silicijum dioksid, ligand koji se često nalazi u hrani i pićima, takođe može smanjiti apsorpciju Al (74).

Organski ligandi koji se nalaze u hrani kao što su fitati i polifenoli formiraju komplekse sa jonom Al i sprečavaju njegovu apsorpciju (75). Joni metala (Na^+ i Ca^{2+}) prirodno su prisutni u hrani i piću. Istraživani su efekti Na^+ i Ca^{2+} , pojedinačno i u kombinaciji, na crevnu apsorpciju Al^{3+} kod pacova. Registrovane su jednostrane negativne interakcije između jona Al i natrijuma (Al^{3+} može da istiskuje Na^+ , ali ne i suprotno) i između jona kalcijuma i Al (Ca^{2+} može da zameni Al^{3+} , ali ne i suprotno) tokom procesa unosa preko sluzokože. Obe interakcije se odvijaju na sistemskom nivou. Ca^{2+} ima negativnu interakciju sa Na^+ na sistemskom nivou, ali pojačava unos Na^+ . Ovih rezultati doveli su do zaključka da jon Al^{3+} oponaša Ca^{2+} u svom crevnom prolazu, koji zavisi od Na^+ (76).

2.6.2. Apsorpcija aluminijuma preko respiratornog trakata

U respiratorni trakt aluminijum dospeva iz prirodnog okruženja udisanjem vazduha, prilikom profesionalne ekspozicije radnika koji rade u proizvodnji Al i prilikom upotrebe kozmetičkih proizvoda u obliku aerosola ili praha. Postojeće studije procenjuju stopu apsorpcije prilikom inhalacije na 1,5-2%, ali ne daju pouzdan odgovor da li se apsorpcija udahnutog Al odvija samo preko pluća ili i oralno, zahvaljujući mukocilijarnom mehanizmu nespecifične zaštite (3). Ovaj mehanizam omogućuje pokretima trepljastog epitela prebacivanje stranih čestica obalepljenih sluzi iz respiratornih puteva u gornji gastrointestinalni trakt. Aluminijum koji dospe u nosnu šupljinu deluje pored respiratornog epitela i na olfaktorni epitel, a aluminijum rastvoren u sluzi, koji ostane unutar respiratornog epitela predstavlja lokalni i sistemski izvor biološki dostupnog Al (77). Dendriti ćelija olfaktornih receptora nalaze se u direktnom kontaktu sa okolinom, pa su, stoga, pinocitoza i neuronski transport mogući mehanizmi za unos potencijalnih toksina u centralni nervni sistem. To se pre svega odnosi na sitne čestice manje od 2,5 mikrometra (78). Cilije mirisnog epitela nisu pokretne, ali predstavljaju veliku površinu pokrivenu sluzi sa kojom aluminijum dolazi u kontakt i u kojoj može da se rastvara. Olfaktorni epitel je u osnovi produžetak olfaktornog nerva i olfaktornog bulbosa i predstavlja put kojim Al može da dospe u mozak bilo u obliku kompleksa ili čestica (79). Veličina udahnutih čestica ima uticaj na taloženje i apsorpciju aluminijuma u plućima. Koncentracija Al u plazmi i urinu povećava se više nakon izlaganja dimu nego nakon izlaganja ekvivalentnoj koncentraciji prašine. U alveole dospevaju samo ultrafine čestice manje od $0,1 \mu\text{m}$.³ Alveolarni makrofagi mogu da fagocituju nerastvorljive čestice i da ih skladište u regionalnim limfnim čvorovima. Velika površina i

dinamična priroda plućnog epitela čini ga pogodnim mestom za unos aluminijuma, a bogata prokrvljenost pruža pristup sistemske cirkulaciji (25).

Procese proizvodnje i prerade Al prati oslobađanje različitih čestica, dima i gasova koje mogu da deluju štetno na respiratorni sistem. Kod profesionalno eksponiranih osoba Al dospeva u pluća uglavnom u obliku slabo rastvorljivih jedinjenja kao što su čestice Al silikata. Izloženost prašini i dimu Al vrlo retko dovodi do difuznih parenhimskih promena karakterističnih za aluminozu, granulome, plućne alveolarne proteinoze i deskvamativne intersticijalne upale pluća (80). Utvrđeno je da su dobri prediktori patološkog nalaza na plućima višegodišnja ekspozicije, povećana koncentracija Al u plazmi i urinu i smanjen vitalni kapacitet (81). Referentne vrednosti za unutrašnje opterećenje Al su $<15 \mu\text{g/l}$ u urinu i $<5 \mu\text{g/l}$ u serumu. Vrednost biološke tolerancije kod profesionalno izloženih osoba je $50 \mu\text{g}$ aluminijuma po gramu kreatinina u urinu (82).

2.6.3. Apsorpcija aluminijuma preko kože i parenteralnim putem i njegova distribucija u organizmu

Smatra se da je zdrava koža solidna barijera i da sprečava apsorpciju aluminijuma (58). Transport lokalno aplikovanog Al, u obliku antiperspiranta ili kreme za sunčanje, preko ovog sloja minimalan je i podrazumeva pasivnu difuziju transcelularnim i paracelularnim putem (83). Očuvani stratum corneum sadrži izvodne kanale znojnih i lojnih žlezda kao i folikule dlaka, a oni omogućuju pristup epidermisu, dermisu i hipodermisu. Utvrđeno je da prilikom lokalne primene samo vrlo mali deo aluminijuma ulazi u krvotok i izlučuje se preko bubrega. Deo tog aluminijuma može da se zadrži unutar struktura kože, a postoji i mogućnost ulaska u limfni sistem (25). Prodor aluminijuma u kožu beznačajan je kod odraslih sa zdravom kožom ($<0,01\%$), ali je prilično značajan kod novorođenčadi ili male dece, kao i kod odraslih sa lezijama kože. Osobine jedinjenja koja se primenjuju lokalno, količina Al koja se u njima nalazi i redovna upotreba čine da koža, pogotovo ako je oštećena, može biti izvor biološki dostupnog aluminijuma (25). Procene toksičnosti vršene su na osnovu merenja i izračunavanja srednje brzine izlučivanja apsorbovanog ^{26}Al preko bubrega. Izračunata je prosečna stopa apsorpcije od $0,012\%$ (83). Druga, sveobuhvatnija studija toksikokinetike kod ljudi utvrdila je vrlo slične stope apsorpcije kroz netaknutu kožu od $0,002\text{-}0,06\%$ sa srednjom vrednosti od $0,0094\%$ (84). Zavisno od starosne grupe, kada je u pitanju zdrava koža standardna apsorpcija aluminijuma iznosi $0,6\%$, a kod ogoljene kože $10,7\%$. Apsorpcija Al je značajno veća kod osoba koje često briju pazuh ili imaju oštećenu kožu (85). Kod njih je

zabeleženo prekoračenje dozvoljene doze čak za 300-940 puta. Veliko prekoračenje (15-50 puta) zabeleženo je kod potrošača koji koriste više kozmetičkih proizvoda (85). Kada se Al primenjuje parenteralno, nakon ubrizgavanja, cela doza difunduje kroz različite odeljke telesne tečnosti. Da bi se izbegla akumulacija, prema preporukama američke Agencije za hranu i lekove, nivo Al u parenteralnim rastvorima treba da bude $< 25 \text{ mg/l}$ i $< 10 \text{ mg/l}$ u tečnosti za dijalizu (86,87).

Distribucija Al koji je dospao u sistemsku cirkulaciju vrši se preko telesnih tečnosti. Relevantni podaci pokazuju da bi i limfni sistem može imati ulogu u transportu aluminijuma u biološkom sistemu kroz (25,83,84). Aluminijum se nalazi u krvi vezan za serumske i ćelijske frakcije, a najveći deo koji se distribuira plazmom vezan je za transportni protein transferin (90%). Oko 8% aluminijuma vezano je za ligande male molekulske težine, kao što su citrat i fosfat, koji takođe igraju ulogu u raspodeli aluminijuma između krvi i tkiva (84,88). Aluminijum može napustiti krv na više načina, a ne samo receptorski posredovanom endocitozom kompleksa transferin-aluminijum, pri čemu je ulazak u ćelije relativno spor. Postoji 5 glavnih načina kojima bi se Al mogao transportovati kroz ćelijske membrane: paracelularno; transcelularno; aktivnim transportom; kanalima; i adsorpcijom ili endocitozom posredstvom receptora. Postoji i pet oblika Al koji mogu da se unesu ovim transportnim mehanizmima: slobodni, trovalentni katjon Al^{3+} rastvoren u vodi; neutralni, rastvorljivi kompleksi male molekulske težine; neutralni, rastvorljivi kompleksi velike molekulske težine; naelektrisani, rastvorljivi kompleksi male molekulske težine; nano i mikročestice (25).

Akumulacija aluminijuma odigrava se u gotovo svim tkivima, a najviše u testisima, jetri, kostima, mišićima, bubrezima i mozgu. Aluminijum prelazi iz krvi u mozak na dva načina: endocitozom posredstvom receptora za transferin, koji su prisutni na nivou krvno-moždane barijere i aktivnim transportom aluminijum citrata uz pomoć adenozin trifosfata (87).

Dokazano je da ukupni telesni sadržaj aluminijuma kod zdravih ljudi iznosi približno 30-50 mg/kg telesne mase, a koncentracija u serumu iznosi između 1-3 mg/l (3), pri čemu je deset puta veća koncentracija Al kod pacijenata na hemodijalizi nego kod zdravih osoba. Otprilike polovina ukupne količine Al koji se nalazi u organizmu je u kostima. Sadržaj Al u koštanom tkivu čoveka je od 5 do 10 mg/kg (3). Aluminijum je takođe pronađen u ljudskoj koži, donjim partijama gastrointestinalnog trakta, limfnim čvorovima, nadbubrežnim žlezdama, paratiroidnim žlezdama i u većini organa i mekih tkiva. Kod pacova akumulacija aluminijuma nakon oralnog izlaganja bila je veća u slezini, jetri, kostima i bubrezima nego u mozgu, mišićima, srcu ili plućima (3). Takođe je zabeleženo da može proći placentu i dospeti

do fetusa, može se izlučiti preko mleka i dospeti u organizam odojčadi, a akumulacija u tkivima povećava se sa starenjem (3). Dokazano je da Al brzo dospeva u vanćelijsku tečnost i likvor ali postiže manje koncentracije nego u krvi (3). Status gvožđa nalazi se u negativnoj korelaciji sa akumulacijom Al u tkivima, a eksperimenti na životinjama pokazali su da nedostatak kalcijuma i magnezijuma može doprineti akumulaciji Al u mozgu i kostima.

2.6.4. Eliminacija aluminijuma iz organizma

Aluminijum se izlučuje iz organizma preko stolice, mokraće, znoja, kože, kose, noktiju, sebuma i sperme. Ne postoje literaturni podaci o tačnom udelu načina izlučivanja Al. Stolica je glavni put za izlučivanje oralno unesenog aluminijuma, jer je njegova apsorpcija u gastrointestinalnom traktu manja od 1%. Utvrđeno je da se stolicom izluči između 74 i 96% od unesene količine (25). Apsorbovani aluminijum izlučuje se uglavnom urinom, a poluvreme eliminacije iz krvi iznosi 8 sati. Aluminijum koji se nalazi u tkivima prolazi kroz sporiju fazu eliminacije, jer njegovo poluvreme eliminacije traje nekoliko nedelja. Kada se radi o dugotrajnoj ekspoziciji, Al koji se akumulirao u različitim odeljcima kostiju (trabekularnom i kortikalnom) izlučuje se veoma lagano, jer u tom slučaju poluvreme eliminacije traje godinama. Deo aluminijuma trajno se skladišti u raznim organima, a njegova količina raste sa povećanjem ekspozicije i starenjem (25,58,87).

Podaci o količini izlučenog Al urinom, nisu konzistentni, što je logično, jer količina izlučenog Al zavisi od brojnih faktora koji utiču na apsorpciju Al (58). Čovek dnevno izluči urinom 10-100 mg Al (88), a kinetika klirensa Al iz krvi može varirati za 16-37%. Smatra se da na nju utiču brojni faktori kao što su nutritivni status (nivoi slobodnog transferina dostupnog za transport), oblik teškog metala tj. kombinacija sa drugim nisko molekularnim organskim jedinjenja poput citrata i bikarbonata), starost i pol (88,89). Urinarna ekskrecija povećava se upotrebom hemijskih helatora: deferoksamina, jabučne, malonske, limunsk, oksalne i jantarne kiseline (41). Veća količina aluminijuma izmerena je u znoju nego u urinu (90), a procenjeni dnevni gubitak znojem iznosi 1 mg i 10 puta je veći od dnevnog gubitka urinom (0,1 mg) (90).

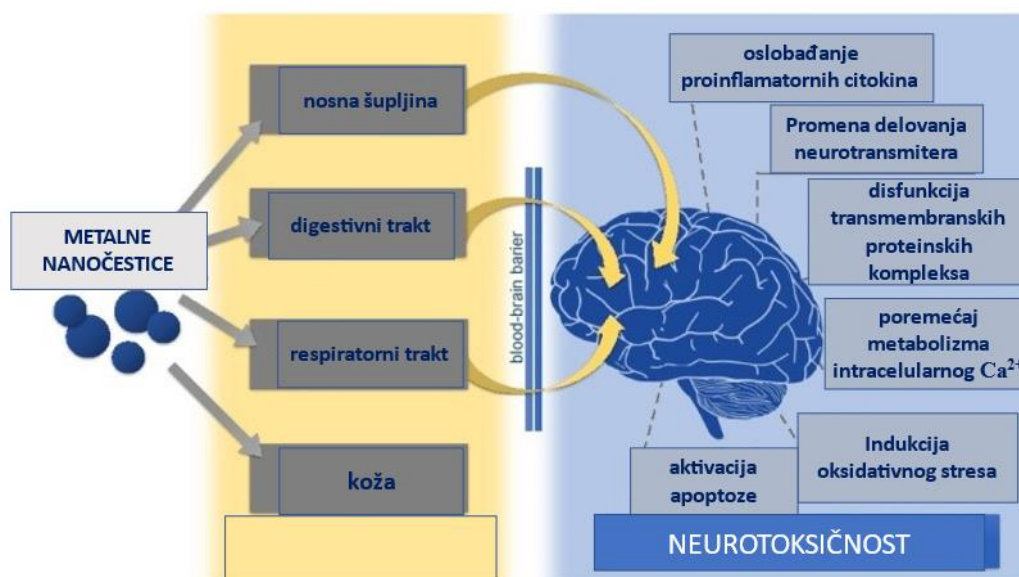
2.7. Patofiziološki aspekti toksičnog delovanja aluminijuma

Toksičnost jedinjenja sa aluminijumom zavisi od brzine i mogućnosti apsorpcije, od puta unošenja, kiselosti sredine i prisustva supstanci koje poboljšavaju resorpciju. To je razlog velikog raspona oralne LD₅₀ za pacove i miševе koji se kreće između 162 i 980 mg/kg

telesne mase. Dugotrajno izlaganje aluminijumu, naročito u uslovima pojačane apsorpcije i smanjene eliminacije kod bubrežne insuficijencije, ima za posledicu razvoj toksičnih efekata. Remeti se homeostaza na molekulskom i ćelijskom nivou, što dovodi do strukturnih i funkcijskih poremećaja. Patofiziološki mehanizmi toksičnog delovanja aluminijuma su veoma složeni i za sada još uvek nedovoljno definisani. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja aluminijum ne pripada grupi kancerogenih materija (41).

2.7.1. Toksični efekti aluminijuma na centralni nervni sistem

Hronična ekspozicija Al povezuje se sa razvojem neurodegenerativnih bolesti kao što su autizam, poremećaj deficita pažnje, amiotrofična lateralna skleroza, Alzheimerova bolest, demencija, sindrom Zalivskog rata i parkinsonizam (41,91-98). Aluminijum deluje neurotoksično različitim mehanizmima kao što su: porast oksidativnog stresa, ćelijski posredovana citotoksičnost, apoptoza, inflamacija, toksično delovanje glutamata, poremećaj homeostaze kalcijuma, promena ekspresije gena, stvaranje neurofibrilarnih klubadi (NFT) i trajna blokade jonskih kanala beta amiloidom ($A\beta$) (92,99).



Slika 2. Toksično delovanje nanočestica aluminijuma na centralni nervni sistem

Modifikovano od Sawicki K, et al. (100)

Izloženost prekomernom unosu aluminijuma uzrokuje poremećaje pamćenja i učenja kod pacova usled taloženja $A\beta$ u hipokampusu i kori. Kod životinja su registrovane neurofizičke i neurobihejvioralne promene slične Alzheimerovoj bolesti (101,102). Hronično intraperitoneumsko aplikovanje velikih doza $AlCl_3$ tokom dužeg perioda smanjuje

lokomotorne i kognitivne funkcije pacova (103). U eksperimentima na životinjama, dozama aluminijuma iznad 200 mg/kg telesne mase dnevno, zabeležene su sledeće promene: mehanička alodinja, zapaljenjski proces perifernog nerva sa povećanim brojem aktivisanih makrofaga uz prisustvo Al u nervnim vlaknima (n. ishiadicus) i porasta parametara koji ukazuju na sistemski oksidativni stres. Pored toga kod tretiranih pacova došlo je do razvoja katalepsije (104). Brojne kliničke studije pokazale su da upotreba dijalizne tečnosti koja sadrži Al kod pacijenata sa insuficijencijom bubrega dovodi do razvoja encefalopatije (105, 106). Za radnike u industriji aluminijuma utvrđen je pad performansi korišćenjem neuropsiholoških testova (za procenu pažnje, pamćenja i učenja), ali kod osoba sa koncentracijama Al većim od 100 µg/g kreatinina u urinu (107), a dokazano je da kontinuirano profesionalno izlaganje aluminijumu može oštetiti ukupnu kognitivnu sposobnost radnika (108-112).

Kombinovanjem fluorescentne mikroskopije specifične za aluminijum sa drugim oblicima svetlosne i fluorescentne mikroskopije vrše se najnovija istraživanja međusobne povezanosti između taloženja aluminijuma i neuropatologije brojnih neurodegenerativnih bolesti i neurorazvojnih poremećaja. U mozgu obolelih od cerebralne amiloidne angiopatije amiloid β je uočen isključivo van ćelija i bio je povezan sa vaskulaturom, a depoziti Al bili su smešteni unutar ćelija. U mozgu osoba obolelih od epilepsije izmerene su velike koncentracije aluminijuma u okcipitanom režnju i hipokampusu, gde su nađeni nespecifični ćelijski ostaci bogati Al (113,114). Neke od najviših koncentracija Al ikad izmerenih u moždanom tkivu čoveka zabeležene su kod osoba sa dijagnozom porodične Alzheimerove bolesti. Potvrđena je bliska veza između Al i amiloida β u porodičnoj Alzheimerovoj bolesti. Kolokalizacija aluminijuma i amiloida β u senilnim plakovima bila je posebno evidentna, a bilo je i primera cerebralne amiloidne angiopatije koji sadrže zajedničke naslage Al i amiloida β . Identifikovana su i neurofibrilarna klubad u ovim tkivima, od kojih neka u neposrednoj blizini senilnih plakova bogatih Al (114-120).

2.7.2. Toksični efekti aluminijuma na respiratorni sistem

Dugotrajna profesionalna izloženost prašini i isparenjima Al i njegovih jedinjenja ima toksične efekte na respiratorni trakt. Studije na radnicima koji rade u primarnoj proizvodnji Al ili sekundarnoj industrijskoj proizvodnji pokazale su porast učestalosti plućne fibroze, u zavisnosti od koncentracije prašine u udahnutom vazduhu. Kod radnika zaposlenih u proizvodnji aluminijumskog praha kod kojih je otkrivena rana faza aluminoze

(kompjuterizovanom tomografijom visoke rezolucije) nađena je značajno veća koncentracija Al u plazmi (82). Ostali poremećaji predstavljeni u literaturi uključuju: plućni alveolitis i alveolarnu proteinozu, astmu, hronični bronhitis i hroničnu upalu pluća. Respiratorni efekat zavisi od toga kom jedinjenju Al su osobe izložene kao i od postupka prerade aluminijuma. Simptomi slični astmi (topioničarska astma) najviše su istraživani toksični efekat Al na respiratorni trakt. Kašalj, *wheezing*, dispneja i oštećena plućna funkcija (smanjeni forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1) i forsiran vitalni kapaciteta (FVC)) su primarne karakteristike ovog poremećaja (3).

Većina studija preseka i longitudinalnih studija pokazala je povećanu pojavu respiratornih simptoma uopšte, kao i astmatičnih simptoma kod radnika u industriji Al u poređenju sa zdravim pojedincima, pri čemu se, sa smanjenjem izloženosti prašini i gasovima, broj radnika sa topioničarskom astmom smanjio tokom poslednje decenije. Studije mortaliteta pokazale su povećanu smrtnost od hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP), a u studijama preseka primećen je povećan broj ispitanika sa opstruktivnim smetnjama među radnicima angažovanim u topionicama koji je rastao sa dužinom trajanja zaposlenja, te je zvaničan stav za zaštitu radnika od aluminijumske toksičnosti sprovođenje preventivnih mera: smanjena izloženost, smanjenje zagađenja u radnoj atmosferi, upotreba zaštite disajnih puteva (respiratorne maske) i prestanak pušenja (3,121-123).

2.7.3. Toksični efekti aluminijuma na koštano i hematopoetsko tkivo

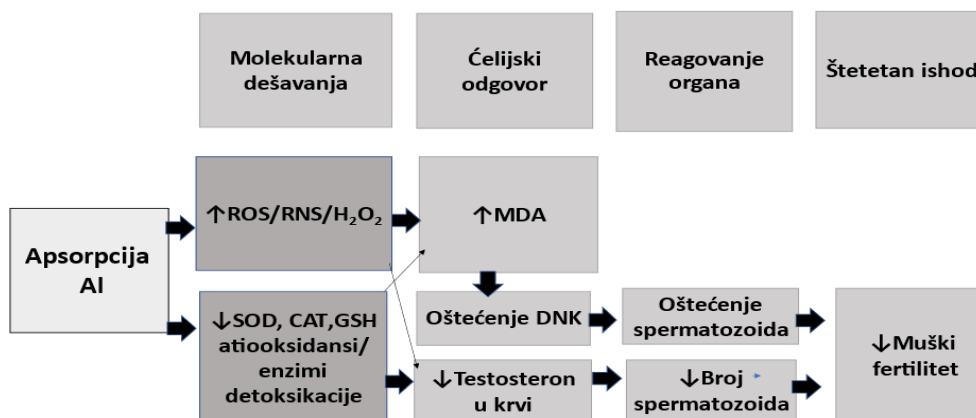
Najveći deo aluminijuma koji se akumulira u telu deponuje se u kostima (124), pri čemu su depoziti aluminijuma nađeni u hidroksiapatitu koštanog matriksa kod pacijenata sa celijakijom i kod pacijenata koji su dugo upotrebljavali antacide sa Al (125,126). Pacijenti sa bubrežnom insuficijencijom, usled toksičnog dejstva Al prisutnog u dijaliznoj tečnosti, često razvijaju osteomalaciju, osteodistrofiju, mikrocitnu anemiju i dijaliznu encefalopatiju. "Aluminijumska bolest kostiju" se karakteriše niskim nivoom paratiroidnog hormona u serumu, a uklanjanje aluminijuma iz dijalizata dovelo je do nestanka ove bolesti kostiju i povećanja nivoa paratiroidnog hormona (PTH) u plazmi (125). Primena Al kod pacova sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom dovodi do smanjenja sinteze i oslobađanja PTH (127). Iako vrlo male doze aluminijuma imaju mitogeni efekat na kosti eksperimentalnih životinja, velike doze inhibišu preoblikovanje kosti usporavanjem aktivnosti osteoblasta i osteoklasta (125,126). Pokazano je u kulturi tkiva osteoblasta neonatalnih pacova da AlCl_3 remeti homeostazu kalcijuma, koji aktivira signalni put Ca^{2+} /kalmodulin-zavisne protein

kinaze II i tako promovise apoptozu osteoblasta (128). Aluminijum se umesto kalcijuma vezuje za svež nemineralizovani kolagen tipa I, na površini mineralizacije kosti, a posledica remećenja kalcifikacije kostiju je razvoj osteomalacije povezane sa hiperkalcemijom i hiperkalciurijom (111).

Hronična intoksikacija Al uzrokuje mikrocitno-hipohromnu anemiju kod pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega (129-131). Ova anemija je rezistentna na terapiju gvožđem, a karakteriše je smanjen broj crvenih krvnih zrnaca, kao i smanjenje koncentracije hematokrita i hemoglobina. Faktori odgovorni za patogenezu anemije koja nastaje toksičnim delovanjem aluminijuma su: skraćen životni vek eritrocita zbog oštećenja integriteta membrane eritrocita; inhibicija dehidrataze δ -aminolevulinske kiseline i smanjeno unošenje gvožđa transferinom, zbog kompetitivne interakcije gvožđa i aluminijuma (132,133). Nishodna regulacija ekspresije receptora za transferin i poremećaj unosa gvožđa posredstvom transferina u ćelije je takođe važan patogenetski faktor za ovu vrstu anemije (129,130).

2.7.4. Toksični efekti aluminijuma na reproduktivni sistem

Pad muške plodnosti koji je zabeležen u dvadesetom veku predstavlja veoma aktuelnu temu savremene nauke. Plodnost muškaraca opala je za 50% tokom nekoliko decenija industrijske revolucije, a danas se pretpostavlja da intoksikacija aluminijumom može biti važan patogenetski faktor (134-136). Utvrđeno je da ekspozicija aluminijumu utiče negativno na razvoj testisa i sintezu testosterona kod eksperimentalnih životinja (137-140). Iako je utvrđeno da je Al sposoban da ugrozi plodnost muškaraca indukcijom oksidativnog stresa u testisima, danas se zna da i drugi mehanizmi, poput inhibicije formiranja mikrotubula, takođe mogu biti uključeni u oštećenje testisa izazvano Al (137-143).



Slika 3. Patogenetski mehanizam štetnog delovanja aluminijuma na muški reproduktivni sistem

Modifikovano od iz Popović N, et al. (142)

Ekspozicija Al negativno utiče na reproduktivne sposobnosti eksperimentalnih životinja: poremećen je morfološki razvoj polnih žlezda, smanjeni su kvalitet i količina sperme i testosterona u testisima i plazmi miševa, deformisane su Sertolijeve ćelije, dokazano je odljuščivanje epitela, tubularna atrofija i stvaranje abnormalnih germinativnih ćelija, smanjenje akcesornih polnih žlezda: semenih kesice, prostate, bulbouretralnih žlezda i semenih kanalića (137-146). Smanjena učestalost skotnosti postoji kod netretiranih ženki parenih sa mužjacima tretiranim intraperitoneumski sa 100 ili 200 mg/kg/dan aluminijum nitrata tokom 4 nedelje, a kod tretiranih mužjaka javlja se značajno smanjenje telesne mase, kao i masa testisa i epididimisa, kao i smanjenje broja spermatida u semenim kanalićima i broja spermatozoida u epididimusu. Velike koncentracije aluminijuma u semenj tečnosti, spermatozoidima, krvi i urinu registrovane su kod muškaraca sa lošim kvalitetom i vitalnošću sperme (134).

Efekti aluminijuma na ženski reproduktivni sistem još uvek nisu dovoljno rasvetljeni. U slučajevima hronične intoksikacije aluminijumom registrovane su histopatološke promene u jajnicima i smanjena plodnost, smanjen broj skotnih ženki i povećan broj apsorbovanih fetusa (143), mladunčad kod kojih je sadržaj aluminijuma u hipokampusu bio značajno povećan. Neurorazvojna toksičnost registrovana je kod potomstva u prvom mesecu starosti u obliku ponašanja sličnog anksioznosti, sa oštećenim performansama za učenje i pamćenje (147). Pored toga registrovano je smanjenje enzimske aktivnosti u jajnicima uz smanjenje ekspresiju receptora za folikulostimulišući hormon (FSH) i luteinizujuć hormona (LH) (148-

150). Studije su verifikovale i smanjenje aktivnosti 3β - i 17β hidrosisteroidne dehidrogenaze, nivoa estradiola, hiperholesterolemiju i značajnu akumulaciju holesterola u jajnicima tretiranih miševa, kao i akumulaciju glikogena u materici (151,152).

2.7.5. Toksični efekti aluminijuma na jetru i kardiovaskularni sistem

Aluminijum se akumulira u jetri manje nego u kostima, sa simptomima toksičnog hepatitisa. Verifikovane patohistološke lezije su: poremećaj arhitektonike jetre i degenerativne promene na ćelijskom nivou: nuklearne varijacije poput karioreksije i piknoze jedra (153), dok su biohemijske abnormalnosti: značajan porast nivoa AST, ALT, alkalne fosfataze i LDH u plazmi, kao i značajno smanjenje ukupnog nivoa proteina u serumu, uz visok nivo oksidativnog stresa (154). Velike doze aluminijuma dokazano izazivaju toksične efekte i oštećuju lizosome u jetri, a obim lizosomskih oštećenja zavisi od doze i trajanja opterećenja (155). Takođe je evidentirano nagomilavanje žučnih kiselina u serumu kod eksperimentalnih životinja i povećano izlučivanje transferina putem žuči (156-157). Smanjenje nekih izoenzima: citohroma P450, nikotin adenin dinukleotid fosfata (NADPH), citohrom C reduktaze i četverostruko povećanje aktivnosti glukuronil transferaze, registrovano je kod pacova tretiranih aluminijumom parenteralno. Ovi nalazi ukazuju na povećanu aktivnost konjugacije, a promene u izoenzimima citohroma P450 mogu izmeniti metabolizam lekova (158).

Jedinjenje aluminijuma koje deluje toksično na srce je aluminijum fosfid (AIP), agrohemijski pesticid koji se koristi u poljoprivredi, a kod intoksikovanih osoba izaziva miokarditis, trombozu leve komore i disfunkciju srčanog mišića.

2.7.6. Toksični efekti aluminijuma na kožu

Apsorpcija Al preko netaknute kože je mala (<0,01%) i smatra se da ona predstavlja efikasnu barijeru (82), ali je apsorpcija kod novorođenčadi i male dece veoma značajna, kao i kod odraslih sa lezijama kože. Efekti aluminijuma na kožu zavise od oblika jedinjenja jer je dokazano da metalna prašina, koja je nerastvorljiva i aluminijum oksid koji je slabo rastvorljiv u vodi i lipidima ne ispoljavaju akutnu dermalnu toksičnost i nadražujući efekat na kožu i oči (159-162). Istovremeno, $AlCl_3$ burno reaguje sa vodom i može da izazove iritaciju i teške opekotine očiju i kože. Štetni efekti aluminijuma dokazani su u ćelijskim kulturama fibroblasta kože čoveka. Eksperimentom je dokazana značajna proizvodnja malonodialdehida

(MDA) 24 sata nakon inkubacije sa Al, što je definisano kao mehanizam citotoksičnog delovanja aluminijuma (85).

2.8. Patogenetski mehanizmi delovanja aluminijuma

Rezultati kliničkih i eksperimentalnih studija sugerišu da postoji više različitih patogenetskih mehanizama hronične intoksikacije aluminijumom. Najviše izučavani su: oksidativni stres, poremećaj funkcije membrana, poremećaj unutarćelijske signalizacije i promena ili inhibicija enzimskih funkcija. Navedeni patogenetski mehanizmi mogu delovati samostalno ili sinergistički i prouzrokovati značajna oštećenja tkiva (90).

2.8.1. Toksično delovanje aluminijuma i oksidativni stres

Veliki broj studija pokazao je da postoji značajna veza između hronične ekspozicije aluminijumu i porasta oksidativnog stresa. Postoji nekoliko mehanizama koji dovode do neravnoteže između proizvodnje slobodnih radikala i antioksidativnog odbrambenog sistema, pri čemu se zna da aluminijum učestvuje u poremećaju homeostaze jona metala i razvoju oksidativnog stresa kroz stvaranje reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih vrsta (RNS) (163,164). Oksidativni stres ima višestruki efekat na strukturu i funkciju molekula i dovodi do lipidne peroksidacije, modifikacije proteina i oštećenja DNK. Dokazano je da usled toksičnog delovanja aluminijuma nastaje oksidativni stres koji dovodi do apoptoze tretiranih ćelija i smanjenja nivoa ćelijskog ATP (65). Ovakav način delovanja dokazan je na primeru oštećenja testisa posredstvom iscrpljivanja antioksidativnih enzima i indukcijom NO nusproizvoda, sa posledičnom inhibicijom steroidogeneze (166,167). Iako aluminijum ne podleže redoks-promeni, on može pojačati biološku oksidaciju uslovljenu gvožđem, stvaranjem aluminijum superoksida i katalizovanjem stvaranja H₂O₂ uz smanjenje Fe³⁺ (168). Stvarajući labilnu rezervu gvožđa (redoks-aktivno gvožđe), aluminijum ometa ćelijske puteve metabolizma gvožđa. Ova labilna rezerva gvožđa ima kapacitet za promociju ROS-a. Regulacija se ostvaruje preko regulatornih proteina citozalnog gvožđa i mehanizama na koje oni utiču, kao što su unos, skladištenje gvožđa i razgradnja ili sinteza feritina (169). Ova veza dokazana je na životinjskim modelima gde je utvrđeno da su nivoi Al u serumu u obrnutoj korelaciji sa nivoima Fe u serumu, što implicira da intoksikacija Al utiče na metabolizam Fe (169). Aluminijum može da istisne i druge biološke katjone: kalcijum, cink, bakar i magnezijum, koji mogu katalizovati transformaciju vodonik-peroksida u visoko reaktivni hidroksilni radikal i dalje inicirati lipidnu peroksidaciju (170). Drugi mehanizam štetnog

delovanja aluminijuma predstavlja remećenje bioenergetike mitohondrija, koje je takođe povezano sa stvaranjem ROS-a (166). Disfunkcija bioenergetike mitohondrija progresivno dovodi do insuficijencije miokarda, jer energetska insuficijencija igra ključnu ulogu u sistolnoj insuficijenciji srca (171).

Na osnovu rezultata nekoliko studija zaključeno je da aluminijum dovodi do promena u aktivnosti antioksidanasa, poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze i glutation peroksidaze/reduktaze (172). Dokazano je da je u slučajevima izloženosti aluminijum u značajno smanjena aktivnost SOD, što sugerise da aluminijum ima katalitičku aktivnost za proizvodnju ROS-a. Smanjene aktivnosti SOD i glutation-peroksidaze (GPKS) mogu se pripisati porastu produkcije lipooksidativnih proizvoda (173). Smanjujući aktivnost glutation sintetaze, Al može usporiti sintezu glutationa (GSH), jednog od najvažnijih antioksidanasa u ćelijama. Pretpostavlja se da se ovaj proces dešava iscrpljivanjem ATP-a, jer aluminijum stvara snažan kompleks sa ATP, zbog visokog afiniteta prema fosfatnim jonima (166). Drugi mehanizam smanjene sinteze GSH predstavlja nedovoljno snabdevanje NADPH zbog inhibicije generacije NADPH koja je prouzrokovana delovanjem aluminijuma. Aluminijum inhibiše NADP-izocitrat dehidrogenazu, jedini enzim koji snabdeva NADPH u mitohondrijima (174,175). Oksidativni disbalans izazvan akon ekspozicije aluminijumu povezan je sa procesom peroksidacije lipida, jer je koncentracija MDA povećana u tkivima nakon izlaganja aluminijumu (176). Aluminijum preko oksidativnog stresa i stvaranja slobodnih radikala pokreće inflamaciju u brojnim tkivima kod eksperimentalnih životinja.

2.8.2. Uticaj aluminijuma na promenu funkcije membrana

Plazmatska membrana predstavlja jedno od ciljnih područja toksičnog delovanja aluminijuma. Kao trovalentni katjon Al se lako uključuje u interakcije sa komponentama membrane i ima potencijal da stvori elektrostatske veze sa ligandima donorima kiseonika ili da stupi u interakciju sa lipidima membrane (166). Takođe, može direktno da promeni električni potencijal i površinski potencijal membrane (177). Vezivanje aluminijuma za lipide membrane dovodi do poremećaja fluidnosti membrane i ona postaje rigidnija, povećava se njena propustljivost i menja se funkcija receptora, što na kraju utiče na pokretljivost i vitalnost ćelija (166,178). Sve ove promene dalje utiču na odvijanje procesa unutar ćelija kao što su inaktivacija enzima, oštećenje DNK i mogu dovesti do smrti ćelija. Hronična neurotoksičnost koju izaziva Al povezana je sa peroksidacijom lipida u moždanim ćelijama i izmenjenim metabolizmom lipoproteina (179). Aluminijum poseduje sposobnost da menja

propustljivost krvno-moždane barijere (166,180) i da menja ultrastrukturu i ekspresiju okludina i F-aktina, povećavajući propustljivost krvno-moždane barijere (180-182).

2.8.3. Aluminijum i poremećaj ćelijske signalizacije

Utvrđeno je da joni aluminijuma mogu modifikovali nekoliko unutarćelijskih signalnih puteva. Aluminijum ometa signalizaciju sekundarnih glasnika, uključujući cAMP, Ca^{2+} i fosfoinozimid i inositol-1,4,5-trifosfat (IP3), koji su uključeni u razne procese, kao što su rast ćelija, diferencijacija i apoptoza (183) i menja cAMP i nivo cikličnog GMP (koji je manje osetljiv od AMP). Pretpostavljeni mehanizam je stimulacija G-proteina adenilat ciklazom, jer aluminijum može da zameni Mg^{2+} koji obezbeđuje strukturu trifosfata u GMP (184). Dokazano je i da je aluminijum efikasan blokator voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala i da blokira ulazak kalcijuma u ćeliju i inhibiše $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP-azu (na nivou endoplazmatskog retikuluma), od koje zavisi sekvestracija Ca^{2+} iz citozola. Aluminijum povećava aktivnost Ca^{2+} -ATPaze, slično kao Mg^{2+} , ali takođe premešta ova dva molekula i na taj način narušava transport kalcijuma (185). U slučajevima hronične intoksikacije aluminijumom dokazana je smanjena aktivnost Ca^{2+} -ATP-aze, glavnog enzima koji „izbacuje“ kalcijum i značajan porasta „influxa“ unosa kalcijuma preko voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala (186), uz sposobnost da pri određenim uslovima (odgovarajuća koncentracija i pH) trajno smanjuje struje voltažno zavisnih kalcijumovih kanala (118).

2.8.4. Promena funkcije enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfata usled dejstva aluminijuma

Na osnovu opisanih mehanizama aluminijumske intoksikacije može se zaključiti da ovaj element ima značajan uticaj na metabolizam i funkciju ćelijskih proteina. Aluminijum može da se veže za DNK i RNK i izazove promenu ekspresije proteina. Može da izazove direktnu inhibiciju nekoliko enzima, kao što su heksokinaze, fosfataze, fosfodiesteraze i fosfooksidaze, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i NADP izocitrat dehidrogenaza. Zna se da inhibiše heksokinazu, jer zamenjuje jon magnezijuma u Mg-ATP-azi, koja je supstrat za heksokinazu (188). Takođe povećava aktivnost γ -glutamil transpeptidaze, a smanjuje aktivnost glutacion sintaze (GSH) i glutacion disulfid-reduktaze (GSSG) (175). Ekspozicija AlCl_3 izaziva značajne promene crevnih enzima i ekspresije proteina, što dovodi do što razvoja rezistencije na lekove (189). Promenom metabolizma fosfoinozitida, aluminijum uzrokuje promenu citoskeleta i dovodi do abnormalnosti ogledane kroz promenu ćelijske

pokretljivosti i vitalnosti (168). Azot monoksid, čije stvaranje je povećano usled delovanja aluminijuma, reaguje sa superoksidom ili vodonik-peroksidom pri čemu se generišu reaktivnija jedinjenja koja uzrokuju oksidaciju tiol proteina (166).

2.9. Kalcijumovi kanali

Kalcijumovi kanali su jonski kanali građeni od transmembranskih proteina koji formiraju pore za ulazak kalcijuma u ćeliju. Joni kalcijuma imaju ulogu sekundarnog glasnika u brojnim procesima: električnoj sprovodljivosti, neurotransmisiji, neuroendokrinoj sekreciji, kontrakciji i genskoj transkripciji. Razlikujemo: ligand-zavisne i voltažno-zavisne kalcijumove kanale (VZKK) (190). Ligand-zavisni kalcijumovi kanali mogu biti smešteni intracelularno i ekstracelularno a svoju aktivnost ostvaruju vezivanjem za ligande. Voltažno-zavisni kalcijumovi kanali zastupljeni su na ćelijskim membranama svih ekscitabilnih ćelija (nervnih, mišićnih ćelije i neuroendokrinih), a u manjejoj meri i na membranama neekscitabilnih ćelija. Svoju aktivnost ostvaruju zahvaljujući promeni potencijala na ćelijskoj membrani (191) i prema njihovim biofizičkim karakteristikama delimo ih na one koji se aktiviraju pri nižim potencijalima (*low voltage-activated (LVA)*) i kalcijumove kanale koji se aktiviraju pri višim potencijalima (*high voltage-activated (HVA)*).

Postoji nekoliko vrsta HVA kalcijumovih kanala: L, N, P/Q i R tip, koji se strukturno razlikuju. Oni predstavljaju kompleks nekoliko različitih podjedinica: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ i δ . Kalcijumovi kanali skeletnih mišića su kompleksi $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, $\beta 1-4$ i γ podjedinica, a kalcijumovi kanali iz neurona su građeni od $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, and β podjedinica (191). Osnovna zajednička komponenta svih kalcijumovih kanala je $\alpha 1$ -podjedinica, za koju postoji više od 10 gena i koja formira poru kroz koju prolaze joni kalcijuma, a pridružene podjedinice imaju nekoliko funkcija, uključujući modulaciju provođenja (192). Za α podjedinicu voltažno zavisnih kalcijumovih kanala ($\text{CaV}\alpha$) postoje dve grupe gena pa razlikujemo dve familije: $\text{CaV}1$ i $\text{CaV}2$. Porodica $\text{CaV}1$ obuhvata četiri gena: $\text{CaV}1.1$ (CACNAIS), $\text{CaV}1.2$ (CACNAIC), $\text{CaV}1.3$ (CACNAID), i $\text{CaV}1.4$ (CACNAIF), koji su zaduženi za kodiranje četiri različita kanala L tipa. Porodica $\text{CaV}2$ kodirana je sa tri gena: koji su odgovorni za P/Q tipove $\text{CaV}2.1$ (CACNA1A), za N-tip $\text{CaV}2.2$ (CACNA1B) i za R-tip kalcijumovih kanala $\text{CaV}2.3$ (CACNA1E) (193).

Kalcijumovi kanali T-tipa aktiviraju se pri nižim potencijalima i javljaju se samo u obliku podgrupe $\text{CaV}3$, koja sadrži gene za tri različite $\alpha 1$ podjedinice: $\text{CaV}3.1$ (CACNA1G), $\text{CaV}3.2$ (CACNA1H) i $\text{CaV}3.3$ (CACNA1I). Kalcijumovi kanali T-tipa su raspoređeni po

celom telu, ali su najzastupljeniji u vaskularnom sistemu (uloga pacemakera), neuronima, talamusu i u kostima (osteocitima) (194). Porodica CaV1 inicira kontrakciju, sekreciju, regulaciju ekspresije gena, integraciju sinaptičkog unosa u neurone i sinaptički prenos u specijalizovanim senzornim ćelijama. Porodica CaV2 je prvenstveno odgovorna za pokretanje sinaptičkog prenosa u brzim sinapsama, a porodica CaV3 je važna za ponavljano pražnjenje akcionih potencijala u ćelijama kod kojih postoji ritmično pražnjenje kao što su srčani miociti i talamički neuroni (191).

Za kodiranje β podjedinice voltažno zavisnih kalcijumovih kanala (CaV β) odgovorna su četiri gena kod kičmenjaka. Ona spada u citoplazmatske proteine koji se vezuju za CaV α 1 i sprečavaju ubikvitinaciju i zadržavanje na nivou endoplazmatskog retikuluma. Postoje i četiri različita tipa α 2 δ podjedinice. Podjedinica CaV α 2 δ promoviše membransku ekspresiju regulišu ekspresiju i internalizaciju CaV α 1 podjedinice i može menjati funkcionalne i farmakološke karakteristike kalcijumovih kanala, kao i njihovu osetljivost na sekundarne glasnike. VZKK su normalno zatvoreni pri fiziološkom, odnosno membranskom potencijalu mirovanja i otvaraju se pri depolarizovanim membranskim potencijalima. Koncentracija Ca²⁺ jona obično je nekoliko hiljada puta veća izvan ćelije nego u njoj, aktivacija određenih VZKK omogućuje priliv Ca²⁺ u ćeliju, i u zavisnosti od tipa ćelije, dolazi do aktivacije kalijumovih kanala osetljivih na kalcijum i mišićne kontrakcije, ekscitacije neurona, regulacije ekspresije gena ili oslobađanja hormona ili neurotransmitera (195). Prekomerna aktivacija VZKK važna je komponenta ekscitotoksičnosti, jer jako povišeni nivoi intracelularnog kalcijuma mogu da dovedu do ekscesivne aktivacije enzima i do razgradnje osnovnih ćelijskih struktura i do intenziviranja apoptoze (192).

2.9.1. Farmakološka blokada kalcijumovih kanala verapamilom

Verapamil je prototipni fenilalkilamin i prvi blokator VZKK koji je uveden u kliničku upotrebu za lečenje kardiovaskularnih bolesti (supraventrikularnih tahiaritmija, hipertenzije, angine pectoris). Danas se smatra i mogućom opcijom za lečenje određenih neurodegenerativnih i psihijatrijskih poremećaja. Farmakološke studije su pokazale da verapamil ima širok terapijski spektar, uključujući antihipertenzivne, antiinflamatorne i antioksidativne efekte, regulaciju funkcije krvno-moždane barijere (usled dejstva na P-glikoprotein), kao i regulisanje homeostaze kalcijuma u ćelijama.

U početku je smatrano da verapamil blokira isključivo VZKK L tipa (alfa podjedinice Cav1.2 i Cav1.3), ali se danas zna da se vezuje i za α podjedinice P/Q tipa

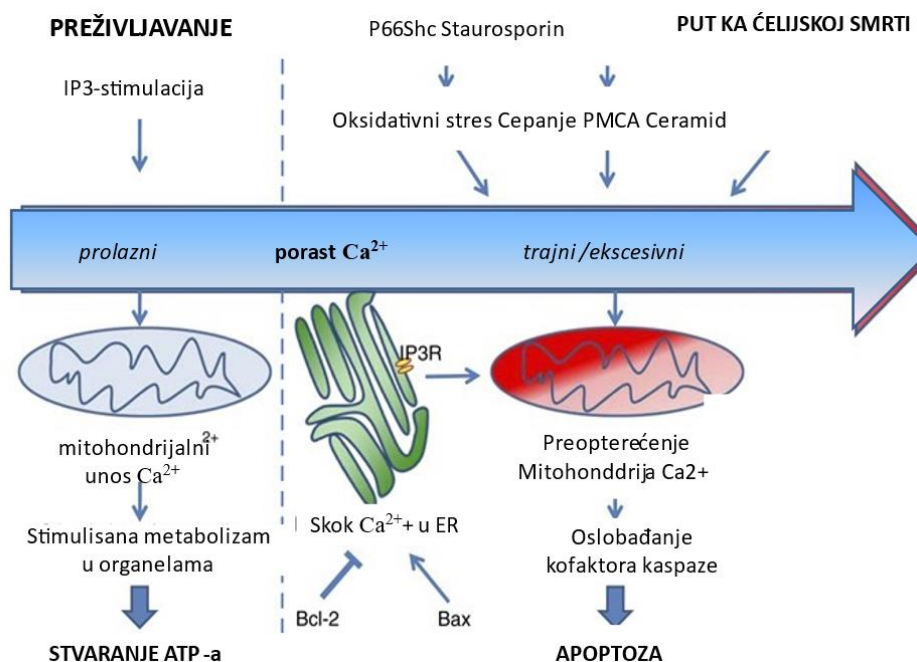
(Cav2.1), N tipa (Cav2.2), R tipa (Cav2.3) i T tipa (Cav 3.1 i Cav3.2). Fenilalkilamini su tercijarni amini i mogu postojati i kao neutralni i kao pozitivno naelektrisani molekuli. Njihova sposobnost da se deprotonuju u neutralni oblik pri fiziološkom pH kritična je za njihovu sposobnost da dopru do mesta vezivanja u unutrašnjoj pori jonskih kanala (195). Verapamil blokira kalcijumove kanale tipa L vezujući se za određeno područje njihove α -1 podjedinice, Cav1.2, koja ima visoku ekspresiju na kalcijumovim kanalima tipa L u vaskularnim glatkim mišićima i tkivu miokarda, gde su ovi kanali odgovorni za kontrolu perifernog vaskularnog otpora i kontraktilnosti srca. Priliv kalcijuma kroz ove kanale omogućava širenje akcionih potencijala neophodnih za kontrakciju mišićnog tkiva i aktivnost električnog pejsmejкера srca. Verapamil se vezuje za ove kanale zavisno od napona i frekvencije, što znači da se afinitet povećava sa smanjenjem potencijala vaskularne membrane glatkih mišića i sa stimulusima koji izazivaju ekscitativnu depolarizaciju (196). Verapamil tonično blokira (u fazi mirovanja), preko unutrašnje pore kanale tipa L sa mikromolarnim afinitetom (u nanomolarnim koncentracijama), a njegov afinitet se povećava kod depolarizovanih membranskih potencijala. U kalcijumovim kanalima tipa T, verapamil blokira sa mikromolarnim afinitetom i ima blago povećan afinitet na depolarizovanim potencijalima (195). Verapamil blokira kanale tipa L/T sa većim afinitetom za depolarizovane kanale nego za kanale u fazi mirovanja. Ovo svojstvo, koje je poznato kao zavisnost od stanja, u početku je bilo opisano kod lokalnih anestetika koji blokiraju natrijum zavisne voltažne kanale. Smatra se da konformacione promene do kojih dolazi pri otvaranju i inaktivaciji stvaraju veći afinitet mesta za vezivanje od onih koja su dostupna u zatvorenim kanalima. U kalcijumskim kanalima L-tipa afinitet verapamila za depolarizovane kanale je 10 puta veći nego za zatvorene kanale. U kanalima tipa T dvostruko je slabije blokiranje depolarizovanih kanala nego zatvorenih kanala u prisustvu 10 M verapamila. Kalcijumski kanali tipa T su podfamilija voltažno kontrolisanih kalcijumskih kanala koji se aktiviraju na relativno hiperpolarizovanim membranskim potencijalima (194).

2.10. Proteini Bcl-2 familije

Apoptoza predstavlja genski regulisan oblik programirane smrti ćelija, kojim se uklanjaju ćelije koje su obavile svoju funkciju. U patološkim procesima, kada patogenetski faktor ošteti ćeliju u toj meri da popravka nije moguća, dolazi do aktivacije apoptoze. Programirana ćelijska smrt ima važnu ulogu u održavanju tkivne homeostaze, prilikom embrionalnog razvoja i u funkcionisanju imuniteta. Gubitak regulatorne uloge apoptoze ima

glavnu ulogu u razvoju tumora, neurodegenerativnih i autoimunskih bolesti. Apoptoza se javlja kao rezultat aktivacije kaspaza, koje razgradnjom esencijalnih proteina vrše destrukciju ćelije. Dva apoptotska puta omogućuju aktivaciju kaspaza: spoljašnji i unutrašnji. Kod unutrašnjeg ili mitohondrijalnog puta (Bcl-2 puta) apoptozu izazivaju različiti stresori (deprivacija faktora rasta, oštećenje DNK ili izloženost citotoksičnim materijama), koji smanjuju unutrašnji membranski potencijal mitohondrija, čime dovode do oslobađanja citohroma C. Oslobođeni citohrom C vrši aktivaciju inicijatora kaspaze-9 pomoću apoptotskog faktora-1, koji aktivira proteazu. Glavni regulatorni proteini unutrašnjeg mitohondrijalnog puta su proteini Bcl-2 porodice (*B cell lymphoma 2*), koji kontrolišu integritet membrane mitohondrija u zdravim ćelijama i povećavaju njenu permeabilnost kao odgovor na apoptotske stimulse. Porodica Bcl-2 proteina deli se na antiapoptotske i proapoptotske protein, a u većini ćelija prisutna je ekspresija niza antiapoptotskih i proapoptotskih Bcl-2 proteina i od njihove interakcije zavisi sudbina ćelije (197,198).

Proteine Bcl-2 porodice delimo na osnovu njihove strukture i funkcije u tri grupe: antiapoptotske proteine Bcl-2 koji imaju sva četiri homologna domena, od BH1 do BH4 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1fl-1); proapoptotske multidomenske efektore (Bax, Bak, Bok) koji sadrže četiri BH domena; i BH3 samo proteine koji sadrže samo BH3 domen (Bim, Puma, Noxa, Bik, Bmf, Bad, Hrk, Bid). Većina članova porodice Bcl-2 takođe ima transmembranski domen (TM), koji im omogućava da se „usidre“ u ogovarajući žleb unutar mitohondrija (198,199).



Slika 4. Uloga kalcijuma u aktivaciji ćelijskog metabolizma ili apoptoze
modifikovano od Pinton P, et al. (199)

Proteini porodice Bcl-2, koji sadrže BH1 i BH2 domene, promovišu opstanak ćelija inhibicijom adaptera potrebnih za aktivaciju kaspaza. Domeni BH1, BH2 i BH3 međusobno reaguju i formiraju hidrofobni žleb na površini proteina, u koji se smešta BH3 domen proapoptotskih partnera i ovaj domen je presudan za njihovu apoptotsku funkciju. Prekomerna izraženost bilo kog antiapoptotskog člana Bcl-2 porodice sprečava smrt pod dejstvom apoptotskih stimulusa. U fiziološkim uslovima dominiraju antiapoptotski proteini. Preživljavanje ćelijske populacije izuzetno retko omogućuje samo jedan antiapoptotski protein, bez obzira na to koliko ga ima u suvišku. Preživljavanje ćelija najčešće se ostvaruje zahvaljujući različitim antiapoptotskim proteinima koji se uključuju u različitim fazama sazrevanja ili adaptacije kod različitih tipova ćelija. Prekomerna ekspresija antiapoptotskih proteina sprečava oslobađanje citohroma C a time i aktivaciju kaspaza (198,199).

Svi proapoptotski proteini sadrže BH3 domen neophodan za dimerizaciju sa ostalim proteinima iz porodice Bcl-2, koji je presudan za njihovu apoptotsku funkciju. Proapoptotski Bax i Bak proteini direktno su odgovorni za oštećenje mitohondrija, ali ih inhibiraju antiapoptotski članovi Bcl-2 porodice. Signali stresa aktiviraju odabrane Bcl-2 homologne (BH) 3 proteine. Multidomenski Bax i Bak glavni su nosioci Bcl-2 apoptskog puta. Kada se aktiviraju, oni permeabilizuju mitohondrije i omogućavaju oslobađanje apoptogenih proteina u citozolu, formiranjem pora u spoljnoj membrani mitohondrija. Prisutnost Bax ili Bak

omogućuje da se citohrom C iz mitohondrija (ili iz makromolekula) oslobodi iz lipidnih vezikula. Bax i Bak imaju identičnu funkciju, ali imaju različite lokalizacije u ćelijama. Bak je protein spoljašnje membrane mitohondrija, neaktivni Bax je uglavnom citozolni protein, a Bid je ključna komponenta ovih oligomera. Bid ostvaruje proširenu konformaciju, koja je kritična za povezivanje sa membranom mitohondrija i koja omogućava direktan intermolekulski kontakt između Bida i Baka, čime se stvara samopropagirajuća mreža koja prožima spoljašnju membranu mitohondrija. Interakcija između antiapoptotskih i proapoptotskih članova Bcl-2 određuje da li će ćelija da živi ili će da nastupi apoptoza (198,199).

Pravilno snabdevanje Ca^{2+} važan je mehanizam za ćelijsko preživljavanje i bioenergetiku, jer je niz Ca^{2+} -zavisnih enzima u mitohondrijama uključeno u ciklus trikarbonskih kiselina i proizvodnju ATP-a. U zdravim ćelijama, mitohondrijski Ca^{2+} uvodi piruvat u ciklus limunske kiseline i olakšava proizvodnju ATP-a. Proteini porodice Bcl-2 imaju važnu ulogu u modulaciji signalizacije Ca^{2+} , što je šematski prikazano na slici 4. Endoplazmatski retikulum predstavlja glavno skladište Ca^{2+} u ćelijama. Proteini porodice Bcl-2 konkurentno regulišu njegovu koncentraciju. Povećana akumulacija Ca^{2+} može dovesti do oslobađanje citokroma C, čime se promoviše apoptoza (199).

3.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Razjasniti potencijalni mehanizam toksičnog delovanja aluminijuma preko uticaja na kalcijumove kanale,
- proceniti mogući protektivni uticaj pretretmana blokadom kalcijumovih kanala pomoću verapamila,
- proceniti deponovanje aluminijuma u tkivu jetre, testisa i bubrega i mogući protektivni efekat verapamila na akumulaciju aluminijuma u ovim organima
- analizirati uticaj hronične ekspozicije različitim dozama aluminijum trihlorida na morfologiju testisa,
- uraditi procenu zastupljenosti degenerativnih promena u tkivu testisa pomoću ImageJ programa za morfometrijske analize,
- proceniti protektivni efekat pretretmana verapamilom na morfološka oštećenja testisa nastala usled hronične ekspozicije različitim dozama aluminijum trihlorida,
- ustanoviti uticaj hronične ekspozicije različitim dozama aluminijum trihlorida na morfologiju jetre,
- utvrditi protektivni efekat pretretmana verapamilom na morfološka oštećenja jetre nastala usled hronične ekspozicije različitim dozama aluminijum trihlorida,
- ustanoviti stepen oštećenja jetre tretiranih grupa životinja na osnovu vrednosti enzima: AST, ALT, LDH i γ GT i proceniti efekat pretretmana verapamilom analizom promene ovih parametara,
- utvrditi koncentraciju aluminijum trihlorida koja dovodi do nastanka mikrocitne anemije na osnovu analize hematoloških parametara (broja eritrocita, hemoglobina, hematokrita, MCV, serumskog gvožđa, UIBC, TIBC, feritina i transferina), ustanoviti vremenski period za razvoj anemije i utvrditi da li pretretman verapamilom sprečava razvoj anemije i
- ustanoviti stepen apoptoze nakon hronične administracije Al u tkivu testisa i jetre primenom apoptotskih proteina Bcl-2 porodice, odnosno ekspresiju antiapoptotskog Bcl-2 i proapoptotskih Bax i Bid markera.

4.0. MATERIJAL I METODE

4.1. Dizajn studije i eksperimentalne životinje

Ovo istraživanje je sprovedeno na muškim albino pacovima Sprague-Dawley soja starim 2 meseca, težine od 130 do 190 grama iz vivarijuma Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu. Tokom čitavog trajanja eksperimenta životinje su hranjene i pojene *ad libitum*. Korišćena je peletirana hrana za pacove Veterinarskog zavoda Zemun. U vivarijumu je održavana temperatura 20 ± 2 °C i relativna vlažnost od $55 \pm 10\%$. Tokom trajanja eksperimenta uspostavljen je ritam svetlo-tama u trajanju od po 12 h, za svetlu i tamnu fazu (07-19 h).

Dizajn i metodologija eksperimenta odobreni su od strane Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede na zahtev Medicinskog fakulteta u Nišu, pod brojem 323-07-01762/2019-05/10. Dizajnom studije predviđeno je korišćenje 36 eksperimentalne životinje, odnosno pacova muškog pola, koji su metodom slučajnog izbora podeljeni u grupe od po 6 životinja. Podgrupe koje su obeležene slovom E (eksperimentalna grupa) i arapskim brojevima 1-4 dobijale su različite doze aluminijum hlorida (AlCl_3) ili AlCl_3 i verapamila, dok su kontrolne grupe označene sa K i V. K grupa dobijala je samo fiziološki rastvor i V grupa je dobijala samo verapamil. Eksperiment je trajao 8 nedelja i za vreme tog perioda životinje su bile tretirane na sledeći način:

- **K**-grupa je tretirana fiziološkim rastvorom intraperitoneumski,
- **E1**-10 mg/kg AlCl_3 intraperitoneumski,
- **E2**-20 mg/kg AlCl_3 intraperitoneumski,
- **E3**-premedikacija verapamilom (gavažom 5 mg/kg telesne mase) i nakon 60 minuta 10 mg/kg AlCl_3 intraperitoneumski,
- **E4**-premedikacija verapamilom (gavažom 5 mg/kg telesne mase) i nakon 60 minuta 20 mg/kg AlCl_3 intraperitoneumski,
- **V**-administracija verapamila gavažom (5 mg/kg telesne mase).

Nakon 8 nedelja životinjama su žrtvovane intraperitoneumskom aplikacijom ketonala, odnosno predoziranje anestetika. Uzeta je krv za biohemijske analize. Nakon toga urađena je disekcija i uzeti su uzorci tkiva jetre, burega i testisa koji su zajedno sa plazmom životinja zamrznuta na -80°C pre izvođenja ostalih analiza.

4.2. Hematološke i biohemijske analize

Laboratorijski parametri određivani su u Centru za medicinsku i kliničku biohemiju Kliničkog centra u Nišu iz uzoraka krvi koji su sakupljeni punkcijom iz srca u vakumske plastične epruvete. Hematološki parametri: crvena krvna zrnca (eritrociti), bela krvna zrnca, trombociti i relativna leukocitarna formula određeni su električnom impedansom. Za određivanje koncentracije hemoglobina (Hg) korišćena je kolorimetrijska metoda. Izračunati su hematokrit, srednja zapremina eritrocita (MCV – mean cell volume), srednja vrednost hemoglobina (MCH – mean cell hemoglobin), srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu (MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration) i apsolutna leukocitarna formula. Svi hematološki parametri su određeni iz pune krvi, sa EDTA K2 antikoagulansom, i određeni su na hematološkom brojaču Celltac MEK 6510K (Nihon Kohden, Tokio, Japan).

Biohemijski analizator AU 680 (Beckman-Coulter, Brea, SAD) sa originalnim reagensima proizvođača korišćen je za određivanje biohemijskih parametara iz seruma. Koncentracija feritina, transferina i slobodni kapacitet vezivanja gvožđa (UIBC – unsaturated iron-binding capacity) određivani su imunoturbidimetrijskom metodom, a koncentracija gvožđa kolorimetrijskom metodom. Zatim su izračunati ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC – total iron binding capacity) i zasićenje transferinom (TSAT – transferrin saturation). Enzimskom kolorimetrijskom metodom određena je aktivnost sledećih enzima: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), amilaze (AMI), laktat dehidrogenaze (LDH), kreatin kinaze (CK) i gama- glutamil transferaza (γ GT). Koncentracije hepcidina i C-reaktivnog proteina merene su u uzorcima plazme pomoću komercijalno dostupnih kompleta ELISA, prema uputstvima proizvođača. Za hepcidin (Elabscience, SAD, Hpcidin za pacove, serija br. AKL9LVVVV5) opseg detekcije je bio 78,13 - 5000 pg/mL sa osetljivošću od 46,88 pg/mL, i mišji CRP (PTKS1) (Abcam, ab157712, Ujedinjeno Kraljevstvo), sa opsegom detekcije 0,78 ug/mL - 100 ug/mL i osetljivošću 0,159 ug/mL.

4.3. Određivanje koncentracije aluminijuma u uzorcima tkiva

Određivanje koncentracije aluminijuma vršeno je na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

4.3.1. Aparatura

Za određivanje aluminijuma u uzorcima tkiva korišćen je optički emisioni spektrometar sa indukovano kuplovanom plazmom (ICP-OES) serije iCAP 6000 (Thermo Scientific, Cambridge, Velika Britanija). Optički sistem čine sferna ogledala i ešelna rešetka, dok je detektor višekanalni, baziran na tehnologiji uređaja za prenos naelektrisanja, tzv. CID detektor (eng. *Charge-Injection Device*) sa obezbeđenim hlađenjem kamere na -45°C . iTEVA operativni softver je korišćen za kontrolu svih funkcija instrumenta i obradu podataka.

4.3.2. Reagensi

Trace CERT[®] (Fluka Analytical, Švajcarska) ICP standardni rastvor Al, koncentracije 1000 ± 4 mg/l, korišćen je za dobijanje kalibracione prave. Svo posuđe je isprano 20% azotnom kiselinom, a zatim destilovanom i dejonizovanom vodom. Za pripremanje rastvora korišćena je dejonizovana voda specifične provodljivosti $0,05 \mu\text{S/cm}$ (MicroMed high purity water system, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH). Korišćeni su sledeći reagensi: azotna kiselina (65%, Fluka, Buchs, Švajcarska), aluminijum-hlorid (Honeywell Fluka), verapamil-hidrohlorid (Verapamil, Alkaloid Skoplje, Severna Makedonija) i ketamin-hidrohlorid (Ketonol[®], AG Wels, Austrija) p.a čistoće.

4.3.3. Priprema uzoraka

Uzorci su pripremani prema postupku koji su opisali Banni i saradnici (200) i Bohrer i saradnici (201), sa malim izmenama. Uzorci su sušeni na temperaturi od 60°C do konstantne mase. Uzorcima tkiva (0,3 grama sa tačnošću na četiri decimale) dodato je po tri mililitara koncentrovane azotne kiseline i uzorci su ostavljeni 48 sati. Dobijeni rastvori su dopunjeni 0,5% azotnom kiselinom do 25 ml.

4.3.4. Optimizacija ICP-OES instrumenta

Za optimizaciju parametara instrumenta korišćen je odnos intenziteta emisionih linija Mg (II) (280,270 nm) i Mg (I) (285,213 nm) veći od 10 (203). U cilju postizanja robusnih uslova plazme, snaga radiofrekventnog (RF) generatora je menjana u intervalu od 750 W do 1350 W za po 200 W, dok su ostali parametri instrumenta bili konstantni: brzina pumpe za analizu-50 rpm, brzina pumpe za ispiranje-100 rpm, protok gasa za hlađenje-12 l/min, protok pomoćnog gasa-0,5 l/min, pravac posmatranja plazme, aksijalni i radijalni. Za dalja ispitivanja korišćena je RF snaga od 1150 W, jer se pri ovoj snazi dobio najveći odnos

intenziteta linija Mg (I) i Mg (II). Dalje, pri aksijalnom posmatranju plazme proučavan je i efekat brzine protoka gasa za raspršivanje. Brzina je menjana u interval od 0,5 l/min do 1,5 l/min, dok je snaga RF generatora bila konstantna (1150 W). Najveći odnos intenziteta linija Mg (I) i Mg (II) dobijen je pri protoku gasa za raspršivanje od 0,5 l/min.

4.3.5. Efekat matriksa i izbor analitičkih linija

Za Al su konstruisane kalibracione prave na četiri izabrane talasne dužine sa najvećim relativnim intenzitetom emisije. Izbor talasne dužine sa minimumom efekta matriksa i spektralnih interferencija određen je postupkom upoređivanja nagiba kalibracione prave dobijene iz standardnih rastvora i kalibracione prave kod koje su standardi „spajkovani” određenom zapreminom rastvora uzorka (n_{kal}/n_{uz}). Matriks efekat (ME) je izračunat prema jednačini:

$$ME = (I_1 / I_2 - 1) \times 100$$

gde je:

I_1 – intenzitet svake od četiri izabrane linije,

I_2 – intenzitet svake od četiri izabrane linije nakon „spajkovanja” kalibracione prave uzorkom.

4.3.6. Recovery test

Uzorci su “spajkovani” određenom zapreminom Al, koncentracije 1000 mg/l i pripremani prema postupku koji je prethodno opisan. Postupak spajkovanja je ponovljen tri puta za svaki uzorak.

4.3.7. Validacija metode

Validacija metode za određivanje Al je obuhvatila ispitivanje tačnosti, preciznosti, linearnosti, kao i određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije. Tačnost metode je ispitana metodom tzv. “spajkovanog” uzorka i davanjem procenta prinosa (recovery). Preciznost merenja je data kao srednja vrednost tri merenja sa pripadajućom standardnom devijacijom (SD) i relativnom standardnom devijacijom RSD (u %). Linearnost je ispitana u intervalu koncentracija od 0 mg/l do 100 mg/l, korišćenjem rastvora sledećih koncentracija: 0 mg/l, 20 mg/l, 40 mg/l, 60 mg/l, 80 mg/l i 100 mg/l i izražena je preko korelacionog

koeficijenta (r) kalibracione prave. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) izračunati su na osnovu jednačina (203):

$$\text{LOD} = (3.3\sigma)/s$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \sigma)/s$$

gde je σ standardna devijacija kalibracione prave i s nagib kalibracione prave. Vrednosti za oba limita su izražene u $\mu\text{g/g}$.

4.4. Patohistološka analiza tkiva

Nakon žrtvovanja životinja uzeti su uzorci jetre i testisa za patohistološku opservaciju. Rutinska obrada tkiva do parafinskih kalupa obavljena je na Katedri za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Tkiva su fiksirana u 10% pufersanom neutralnom formalinu u trajanju do 48 časova. Nakon rutinske obrade, tkiva su ukalupljena u parafin i sečena na mikrotomu (Leica Microsystems, Nemačka) debljine 5 μm . Nakon deparafinacije i procesuiranja u graduisanim alkoholima na isečcima su primenjene su sledeće metode bojenja: klasična histološka hematoksilin-eozin (HE) metoda bojenja

4.4.1. Klasična histološka hematoksilin-eozin metoda bojenja

Hematoksilin-eozilin metoda bojenja korišćena je za patohistološku analizu promena u tkivu testisa i jetre od strane verziranog patologa Centra za patologiju i patološku anatomiju Univerzitetskog kliničkog centra u Nišu. U testisu su analizirani sledeći parametri: smanjenje spermatogeneze, vakuolarna degeneracija i dezorganizacija germinativnog epitela, debljina tunike albugineae, hiperplazija i degeneracija Lajdigovih ćelija, intersticijski edem i stepen kongestije intersticijskih krvnih sudova. Patohistološka analiza tkiva jetre obuhvatila je prisustvo sledećih morfološka promena: degeneracije, piknoze jedara, zapaljenskog infiltrata, proširenosti sinusoida, masnih promena i poremećaja arhitektonike. Ispitivane morfološke promene su kvantifikovane primenom semikvantitativne metode na sledeći način: odsutne (-), slabe (+), umerene (++) i teške (+++). Za analizu i fotografisanje morfoloških promena korišćen je svetlosni mikroskop (Olympus CX43/C, Tokyo, Japan) koji je opremljen imidžing sistemom Olympus cellSens (Olympus cellSens platform, Tokyo, Japan). Za procenu zastupljenosti degenerativnih promena u tkivima jetre i testisa određivana je njihova numerička arealna gustina uz pomoć ImageJ programa za morfometrijske analize na odgovarajućem broju vidnih polja.

4.4.2. Imunohistohemijska Avidin-Biotin Complex (ABC) metoda za detekciju citoplazmatske ekspresije Bax, Bid i Bcl-2.

Za imunohistohemijsku analizu korišćeni su parafinski preseći tkiva debljine 5 μm . Prema protokolu, tkivni preseći su deparafinisani u ksilolu, rehidratirani serijom opadajućih koncentracija etanola i inkubirani u 3% rastvoru vodonik peroksida u metanolu u trajanju od 10 minuta, da bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze. Demaskiranje tkivnih antigena (Bax i Bid) izvršeno je zagrevanjem histoloških pločica u rastvoru citratnog pufera (pH 6,0), dok je za Bcl-2 korišćen pufer pH 8,0, u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 20 minuta. Nakon ovih procedura, preseći tkiva testis i jetre su ispirani u 0,01 M fosfatnom puferu (PBS) i inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelima preko noći na 4°C. Za imunohistohemijsku analizu korišćena su antitela Bax (ab53154), Bid (ab32060) i Bcl-2 (Clone 124 Code M0887) proizvođača Abcam i DAKO i primenjena su razblaženja 1:75, 1:100 i 1:50. Za ručno imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Mous and Rabbit Specific HRP Plus (ABC) Detection IHC Kit-Ready to use; Abcam ab93697). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima i vizualizacije sa 3,3' diaminobenzidinom (DAB), tkivo testisa i jetre je kontrastirano Majerovim hematoksilinom. Pozitivan nalaz predstavlja braonkasto citoplazmatsko prebojavanje. Intenzitet imunohistohemijske reakcije ekspresije Bax, Bid i Bcl-2 ocenjen je kao: negativan (-), slaba reaktivnost (+), umerena reaktivnost (++) i snažna reaktivnost (+++).

4.4.3. Morfometrija tkiva

Morfometrija tkiva je obavljena na Katedri za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Kvantitativna analiza površinske zastupljenosti histoloških struktura testisa i promena koje su nastale eksperimentom kod životinja uključenih u studiju, obavljena je na svetlosno-mikroskopskim, trajnim preparatima, parafinizovanih tkivnih preseka testisa pacova, obojenih hematoksilinom i eozinom. Pod ukupnim povećanjem od x200, na mikroskopu Olympus Bx50 (Olympus, Japan) opremljenim kamerom Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Nemačka), obavljeno je fotografisanje po 10 vidnih polja sa svakog mikroskopskog preparata uzorkovanog organa eksperimentalne životinje. Digitalni zapis je sačuvan u *.tiff formatu (dimenzija: 2048x1536 tačaka-piksela) radi podvrgavanja daljim morfometrijskim analizama. Morfometrijske analize su obavljene u morfometrijskom računarskom programu ImageJ (v 1.46i, Wayne Rasband, NIH, USA). Preko svake od sačuvanih digitalnih fotografija, za potrebe nasumičnog izbora zastupljenosti ciljanih mikroskopskih

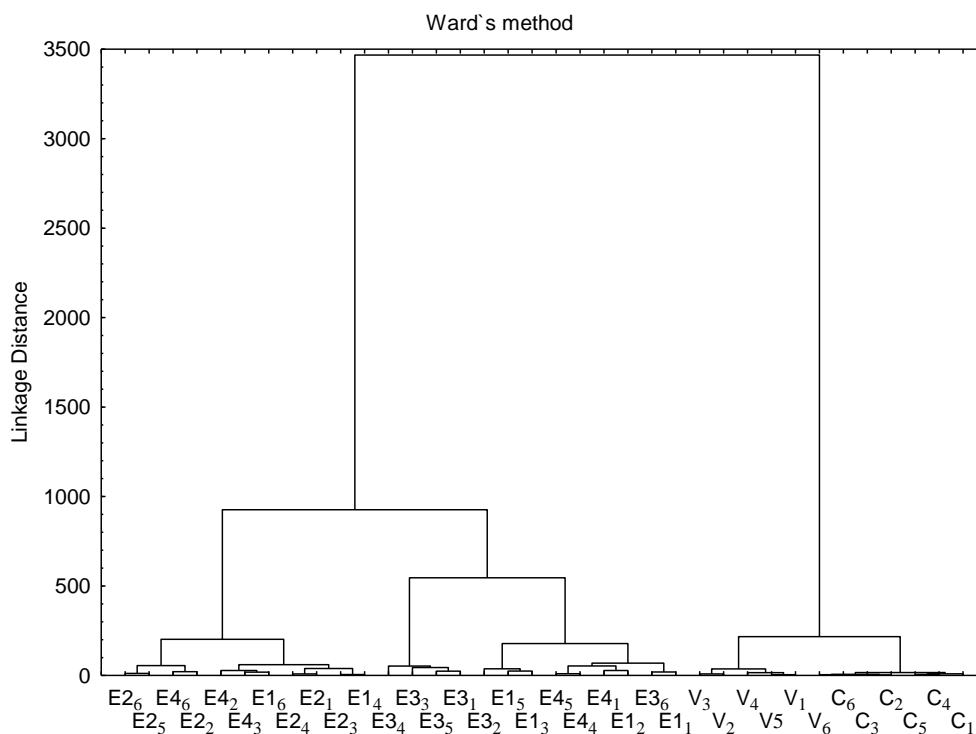
struktura, u spomenutom računarskom programu postavlja se programski generisani kvadratni grafički testni sistem (sa 108 tačaka na ravnomernim rastojanjima, $d=55 \mu\text{m}$).

Ciljane mikroskopske strukture uključene u morfometrijsku analizu bile su: 1) područje intersticijuma testisa, 2) bazalni stratum semenog epitela, 3) adlumenski odeljak semenog epitela, 4) fokusi intraepitelne ablacije, 5) područje lumena semenog kanalića i 6) područje edemskog intersticijuma testisa. Upotrebom programskog dodatka za klasiranje nasumično kolokalizovanih tačaka sa površinom preseka ciljanih mikroskopskih struktura, Cell Counter (Kurt De Vos, University of Sheffield, Academic Neurology, UK), odredi se broj tačaka testnog sistema, koji pripada frakciji određene mikroskopske strukture i time se odredi zastupljenost površine svake od ciljanih mikroskopskih struktura, proporcijom prema ukupnom broju tačaka testnog sistema i ta vrednost, konačno izrazi u procentima.

4.5. Statističke analize

Dobijeni podaci raspoređeni po tipu normalnosti su izraženi srednjim vrednostima kao reprezentativnim merama centralne tendencije i standardnim devijacijama kao merama varijabiliteta. Poređenje parametrijskih obeležja sa normalnim rasporedom vršeno je Studentovim t-testom. Parametrijske vrednosti koje odstupaju od normalnog rasporeda predstavljene su medijanama kao reprezentativnim merama centralne tendencije i interkvartilnim razlikama kao merama varijabilnosti. Poređenje ovih vrednosti je vršeno neparametrijskim Mann Whitney U testom. Poređenje srednjih vrednosti svih evaluiranih hematoloških i biohemijskih parametara u odnosu na tip premedikaciju verapamilom vršeno je analizom varijanse (ANOVA), a utvrđivanje međugrupnih razlika podgovarajućim post hoc testovima. Statistički značajnim smatrane su sve vrednosti za $p < 0,05$ (205).

Dobijene koncentracije aluminijuma u uzorcima tkiva jetre, bubrega i testisa obrađeni su pomoću softverskog paketa Statistica 8.0 (StartSoft, Tulsa, Oklahoma, USA) korišćenjem osnovne komponentne analize (PCA) i klaster analize, grafik 1. Statistički testovi ANOVA i Tukey's test korišćeni su za procenu postojećih razlika u koncentracijama aluminijuma akumuliranim u ispitivanim uzorcima eksperimentalnih i životinja kontrolnih grupa.



Grafik 1. Dendrogram klaster analize tkivnih uzoraka

Klaster analiza je korišćena kao hemometrijski metod. Euklidijska distanca je korišćena za procenu sličnosti uzoraka. Uzorci tkiva bili su grupisani u dva klastera, kao što je prikazano na grafikonu 2, pri čemu je prvi klaster bio podeljen na dva podklastera. Kontrolni uzorci bili su grupisani u jedan subklaster, kao i uzorci tretirani verapamilom (V) koji su činili poseban podklaster. Uzorci u ovom klasteru bili su izdvojeni kao uzorci sa najnižom koncentracijom Al od sve tri vrste uzorkovanog tkiva. Drugi klaster sastojao se od uzoraka koji su bili tretirani različitim koncentracijama aluminijuma (E1, E2, E3 i E4).

5.0. REZULTATI

5.1. Osnovne hematološko-biohemijske karakteristike eksperimentalne grupe Sprague Dawley pacova pre i nakon davanja verapamila

Naše istraživanje obuhvatilo je uzorak od 36 mužjaka Sprague Dawley pacova, pri čemu je u svakoj grupi bilo po 6 životinja. Životinje su tretirane sa 10 mg/kg/TM AlCl₃ (E1 grupa); 20 mg/kg TM AlCl₃ (E2 grupa); 5mg/kg TM verapamila i 10 mg/kg/TM AlCl₃ (E3 grupa); 5 mg/kg TM verapamila i 20 mg/kg TM AlCl₃ (E4 grupa); 5 mg/kg/TM verapamila (V grupa) i odgovarajućom zapreminom 0,9% NaCl kontrolna grupa (K grupa), tokom 8 nedelja. Rezultati hematoloških parametara prikazani su u tabelama od 1 do 6.

Tabela 1. Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/grupa	Eritrociti	Hemoglobin	Hematokrit
K	8,33±0,52	155,17±1,47	47,00±0,89
V	8,30±0,56	152,67±2,07	46,17±0,75
E1	7,86±0,38 ^{a,b}	138,71±11,95 ^{a,b}	39,57±0,98 ^{a,b}
E2	7,14±0,38 ^{a,b,c,d}	126,57±4,68 ^{a,b,c,d}	33,0±2,00 ^{a,b,c,d}
E3	8,14±0,38 ^{a,b,c}	151,29±1,38 ^{a,b,c}	44,14±1,34 ^{a,b,c}
E4	7,67±0,52 ^{a,b,c,d,e}	139,83±2,79 ^{a,b,c,d,e}	37,50±1,38 ^{a,b,c,d,e}
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, p<0,05

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

Hematološki parametri za koje je utvrđeno da su statistički značajno smanjeni nakon primene 10 mg/kg/TM AlCl₃ bili su: broj crvenih krvnih zrnaca (p<0,001), koncentracija hemoglobina (p<0,001), hematokrit (p<0,001), MCV (p<0,001), MCHC (p<0,001), koncentracija gvožđa u plazmi (p<0,001) i saturacija transferina (TSAT) (p<0,001). Statistički značajan porast postojao je u: koncentraciji hepcidina u plazmi (p<0,001), feritina (p<0,001) i transferina, kao i u vrednostima UIBC (p<0,001) i TIBC (p<0,001). Identičan rezultat je dobijen i posle primene 20 mg/kg/TM AlCl₃ sa statističkom značajnošću p<0,001 za sve vrednovane parametre, kako je prikazano u tabelama 1-6.

Nakon primene verapamila, dokazano je statistički značajno poboljšanje hematoloških parametara i to na sledeći način: u broju eritrocita ($p < 0,001$), koncentraciji hemoglobina ($p < 0,001$), vrednosti hematokrita ($p < 0,001$), MCV ($p < 0,001$) i MCHC ($p < 0,001$). Parametri kao što su: hepcidin, feritin, transferin, UIBC, TIBC, gvožđe u plazmi i TSAT nisu pokazali statistički značajne promene nakon primene verapamila, bez obzira na primenjenu dozu $AlCl_3$.

Tabela 2. Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/grupa	MCV	MCH	MCHC
K	55,17±1,17	18,50±0,55	329,67±4,23
V	55,00±1,26	18,33±0,52	330,83±0,75
E1	50,57±1,90 ^{a,b}	17,57±1,51 ^{a,b}	352,14±26,64 ^{a,b}
E2	46,29±1,60 ^{a,b,c,d}	17,57±0,79 ^{a,b,c,d}	381,29±16,89 ^{a,b,d}
E3	53,71±0,95 ^{a,b,c}	18,29±0,49 ^{a,b,c}	341,86±8,76 ^{a,b}
E4	49,83±0,75 ^{a,b,c,d,e}	18,50±0,55 ^{a,b,c}	372,50±10,88 ^{a,b,c,d,e}
p	< 0,001	0,136	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, $p < 0,05$

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

MCV: srednja vrednost zapremine eritrocita; MCH: srednja vrednost apsolutne količine hemoglobin u eritrocitu; MCHC: srednja vrednost koncentracije hemoglobin u eritrocitu.

Tabela 3. Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/grupa	Hepcidin	Feritin	Transferin	Gvožđe
K	71,00±5,40	190,17±48,35	1,47±0,18	39,67±1,86
V	72,00±10,94	187,33±7,26	1,53±0,08	38,17±8,84
E1	185,00±64,54 ^{a,b}	309,29±19,33 ^{a,b}	1,78±0,07 ^{a,b}	27,86±2,26 ^{a,b}
E2	196,43±45,25 ^{a,b,c}	546,14±85,10 ^{a,b,c}	1,85±0,11 ^{a,b,c,d}	20,86±3,08 ^{a,b,c,d}
E3	132,14±33,78 ^{a,b}	282,71±31,45 ^{a,b}	1,67±0,05 ^{a,b}	28,00±3,92 ^{a,b}
E4	160,33±31,46 ^{a,b,c}	456,50±98,92 ^{a,b,c,d}	1,68±0,06 ^{a,b,c,d}	21,83±0,75 ^{a,b,c,d}
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, $p < 0,05$

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

Tabela 4. Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/grupa	UIBC	TIBC	TSAT
K	52,17±7,83	91,50±8,41	0,43±0,04
V	48,17±11,58	92,33±10,71	0,41±0,10
E1	78,00±7,21 ^{a,b}	105,86±6,56 ^{a,b}	0,26±0,03 ^{a,b}
E2	80,29±8,08 ^{a,b,c,d}	101,14±10,14 ^{a,b,d}	0,20±0,02 ^{a,b,c,d}
E3	60,29±9,71 ^{a,b}	88,14±10,25 ^{a,b}	0,32±0,05 ^{a,b}
E4	59,67±7,34 ^{a,b,c,d}	83,17±6,08 ^{a,b,c,d}	0,26±0,02 ^{a,b,c,d}
p	< 0,001	0,001	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, p<0,05

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

UIBC: nezasićeni kapacitet za vezivanje gvožđa; TIBC: totalni kapacitet za vezivanje gvožđa; TSAT: saturacija transferina.

Rezultati prikazani u tabelama 5 i 6 odnose se na promene broja leukocita i trombocita nakon primene različitih doza AlCl₃. Manja doza aluminijuma (10 mg/kg/TM) dovela je do značajnog porasta svih vrednovanih parametara: broja trombocita (p<0,001), ukupnog broja leukocita (p<0,001), procenta limfocita (p=0,004), segmentovanih leukocita (p=0,005) i monocita (p=0,001), kao i u apsolutnom broju limfocita (p<0,001), segmentovanih leukocita (p<0,001) i monocita (p<0,001). Isti rezultat postignut je i nakon aplikacije veće doze aluminijuma (20 mg/kg telesne težine), za sve analizirane parametre. Nije dokazan zaštitni efekat administracije verapamila, pošto nisu verifikovane statistički značajne razlike u ispitivanim parametrima nakon upotrebe verapamila. Svi rezultati prikazani su u tabelama 5 i 6.

Tabela 5. Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/grupa	Limfociti	Segmentovani	Monociti
K	4,20±0,60	3,07±0,60	0,54±0,17
V	4,09±0,24	3,15±0,30	0,48±0,06
E1	5,78±1,14 ^{a,b}	3,33±0,83 ^{a,b}	1,02±0,31 ^{a,b}
E2	5,70±0,76 ^{a,b,c}	4,66±0,94 ^{a,b,c}	1,03±0,22 ^{a,b,c}
E3	4,82±1,01 ^{a,b}	2,96±0,77 ^{a,b}	0,80±0,11 ^{a,b}
E4	3,80±0,97 ^{a,b,c,d}	4,87±1,25 ^{a,b,c,d}	0,74±0,17 ^{a,b,c,d}
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, p<0,05

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

Tabela 6. Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/ grupa	Trombociti (G/l)	Leukociti (G/l)	Limfociti (%)	Segmentovani (%)	Monociti (%)
K	776,50±63,46	7,95±0,83	53,20±5,15	39,82±7,13	6,98±2,05
V	760,17±77,08	7,67±0,52	52,97±1,72	40,725±1,93	6,28±0,75
E1	846,43±90,65 ^{a,b}	10,00±1,83 ^{a,b}	57,16±6,96 ^{a,b}	32,91±6,51 ^{a,b}	9,93±1,15 ^{a,b}
E2	1133,17±1,12 ^{a,b,c,d}	11,5±0,53 ^{a,b,c}	50,10±6,51 ^{a,b,c}	40,87±7,93 ^{a,b,c}	9,03±1,92 ^{a,b,c}
E3	820,71±79,43 ^{a,b}	8,71±0,49 ^{a,b,c}	55,83±9,37 ^{a,b}	34,81±10,17 ^{a,b}	9,36±1,11 ^{a,b}
AlCl₃ 20 E4	1017,17±41,1 ^{a,b,c,d}	9,33±0,82 ^{a,b,c,d}	40,41±9,82 ^{a,b,c,d}	51,65±1,43 ^{a,b,c,d}	7,85±1,74 ^{a,b,c,d}
p	< 0,001	< 0,001	0,004	0,005	0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, p<0,05

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

Efekti hroničnog davanja AlCl₃ (10 ili 20 mg/kg TM) na biohemijske parametre i promene nakon primene verapamila prikazani su u tabelama 7 i 8.

Tabela 7. Biohemijski parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/ grupa	AST	ALT	ALP	Amilaza
K	245,93±17,56	75,55±5,91	405,65±16,51	2356,12±219,65
V	246,17±70,89	75,70±8,32	405,18±11,73	2364,10±131,81
E1	407,11±143,95 ^{a,b}	121,97±48,33 ^{a,b}	421,24±28,04 ^{a,b}	3362,58±124,79 ^{a,b}
E2	527,39±227,4 ^{a,b,c,d}	168,20±32,09 ^{a,b,c,d}	469,87±63,59 ^{a,b,c,d}	3451,43±112,79 ^{a,b,c,d}
E3	285,21±41,11 ^{a,b}	94,20±10,09 ^{a,b}	385,22±34,22 ^{a,b,c}	2710,39±499,39 ^{a,b,c}
E4	342,60±58,89 ^{a,b,c,d}	117,85±19,50 ^{a,b,c,d}	379,00±42,78 ^{a,b,c,d,e}	2387,85±569,49 ^{a,b,c,d,e}
p	0,001	< 0,001	0,002	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, p<0,05

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

AST: aspartat transaminaza; ALT: alanin transaminaza; ALP: alkalna fosfataza.

U slučaju aplikovanja manje doze AlCl₃, registrovan je značajan porast opserviranih parametara i to: aktivnosti enzima AST (p=0,001) i ALT (p<0,001) i koncentracije alkalne fosfataze (p=0,002), amilaze (p<0,001), laktatne dehidrogenaze (p<0,001), kreatin kinaze (p<0,001), γGT (p<0,001) i koncentracije C-reaktivnog proteina (p=0,004). Identična statistička značajnost dobijena je i nakon aplikacije većih doza aluminijum hlorida (20 mg/kg/TM) za iste ispitivane parametre. Zaštitni efekat primene verapamila evidentiran je

kod životinja tretiranih aluminijumom u dozi 10 mg/kg telesne mase u vidu značajnog smanjenja koncentracija u plazmi sledećih parametara ALP ($p < 0,001$), amilaze ($p < 0,001$), LDH ($p < 0,001$), kreatin kinaze ($p < 0,001$) i γ GT ($p < 0,001$). Identičan efekat aplikovanja verapamila zabeležen je kod životinja tretiranih većim dozama $AlCl_3$, gde je takođe uočeno značajno smanjenje vrednosti ALP ($p < 0,001$), amilaze ($p < 0,001$), LDH ($p < 0,001$), CK ($p < 0,001$) i γ GT ($p < 0,001$), što se i može videti u tabelama 7 i 8. Koncentracija CRP u plazmi i aktivnosti enzima: AST i ALT nisu se značajno promenili nakon administracije verapamila.

Tabela 8. Biohemijski parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova

Parametar/ grupa	LDH	Kreatin kinaza	γ GT	CRP
K	2837,30±510,14	1302,63±32,04	0,10±0,13	2,1±0,11
V	2789,90±403,31	1299,77±237,76	0,33±0,20	2,1±0,16
E1	4516,35±1166,46 ^{a,b}	2719,81±817,52 ^{a,b}	1,51±0,23 ^{a,b}	15,5±4,5 ^{a,b}
E2	7147,86±1278,45 ^{a,b,c,d}	3446,76±1492,33 ^{a,b,c,d}	2,09±0,34 ^{a,b,c,d}	22,6±6,6 ^{a,b,c,d}
E3	3058,11±581,03 ^{a,b,c}	2113,59±687,64 ^{a,b,c}	0,91±0,40 ^{a,b,c}	14,6±5,2 ^{a,b}
E4	4911,72±2332,59 ^{a,b,c,d,e}	2320,35±331,43 ^{a,b,c,d,e}	0,67±0,39 ^{a,b,c,d,e}	20,5±4,5 ^{a,b,c,d}
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,004

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, $p < 0,05$

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.

LDH: laktatna dehidrogenaza; γ -GT: gama glutamil transferaza, CRP-C: reaktivni protein.

5.2. Optimizacija operativnih uslova plazme

Od rezultata prikazanih u tabeli 9, najviši odnos Mg II/Mg I od 11,4 odnosno 12,5 za aksijalni i radijalni režim, bio je na nivou RF snage 1150W i ta vrednost bila je izabrana za dalji postupak. Pri korišćenju RF snage 1150 W, protok kroz nebulizator varirao je od 0,5 l/min do 1,5 l/min. Od rezultata u tabeli 5, najviši odnos Mg II/Mg I od 11,4 i 12,9 za aksijalni i radijalni režim bio je kod protoka gasa kroz nebulizator od 0,5 l/min. Ova vrednost je izabrana za dalji postupak.

Tabela 9. Rezultati (prosečna vrednost \pm SD, n=3) dobijeni za RF snagu i protok gasa kroz nebulizator u aksijalno/radijalnom režimu

Režim posmatranja	RF snaga (W)	Relativni intenzitet \pm SD na 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet \pm SD na 285,213 nm	RSD (%)	Intenzitet Mg II/Mg I odnos
Aksijalni	750	417962 \pm 1156	2,76	63312 \pm 1930	3,04	6,6
	950	875320 \pm 5617	0,64	91784 \pm 756	0,82	9,5
	1150	1307120 \pm 4920	0,37	114660 \pm 631	0,55	11,4
	1350	1378451 \pm 7167	0,52	128827 \pm 786	0,61	10,7
Radijalni	750	29715 \pm 235	0,79	3069 \pm 20	0,65	9,7
	950	34814 \pm 319	0,92	3193 \pm 26	0,81	10,9
	1150	41689 \pm 243	0,58	3336 \pm 21	0,63	12,5
	1350	43623 \pm 329	0,75	3697 \pm 28	0,76	11,8

Režim posmatranja	Protok gasa kroz nebulizator (l/min)	Relativni intenzitet \pm SD na 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet \pm SD na 285,213 nm	RSD (%)	Intenzitet Mg II/Mg I odnos
Aksijalni	0,5	1359208 \pm 18625	1,4	119235 \pm 908	0,8	11,4
	1,0	1102895 \pm 1923	1,7	103956 \pm 1034	1,0	10,6
	1,5	1049574 \pm 1985	1,9	107567 \pm 1290	1,2	9,8
Radijalni	0,5	38920 \pm 350	0,9	3019 \pm 18	0,6	12,9
	1,0	34751 \pm 417	1,2	2945 \pm 24	0,8	11,8
	1,5	29564 \pm 325	1,1	2763 \pm 28	1,0	10,7

5.3. Efekat matrice i izbor analitičkih linija

Izbor analitičke linije i u aksijalnom i u radijalnom režimu posmatranja plazme nakon proučavanja odnosa $\text{slope}_{\text{cal}}/\text{slope}_{\text{cam}}$ i efekta matrice prikazan je u tabeli 10. Konačni izbor talasne dužine uzima u obzir tačnost dobijenu za svaku liniju aluminijuma i spektralne interferencije. Jednom kada je potvrđeno stanje bez spektralnih interferencija, izračunat je ME (efekat matrice) za svaku liniju aluminijuma pomoću jednačine. Najniži efekat ME (1,3%) bio je za analitičku liniju aluminijuma 308,215 nm. Shodno ME efektu i odnosu $\text{slope}_{\text{cal}}/\text{slope}_{\text{sam}}$, za dalje analize odabrana je linija od 308,215.

5.4. Validacija

Granice detekcije i kvantifikacije sa linearnim opsegom kalibracionih kriva i koeficijentima korelacije dati su u tabeli 10. Prema dobijenim vrednostima za koeficijent korelacije ($r=0,99998$) za izabranu analitičku liniju od 308,215 nm, linearnost je bila dobra u proverenim intervalima.

Tabela 10. Analitička linija izabrana u $\text{slope}_{\text{cal}}/\text{slope}_{\text{cam}}$ odnosu i efekat matrice (ME), kao i linearni opseg, LOD, LOQ i koeficijent korelacije (r) kalibracione krive za determinisanje koncentracije aluminijuma

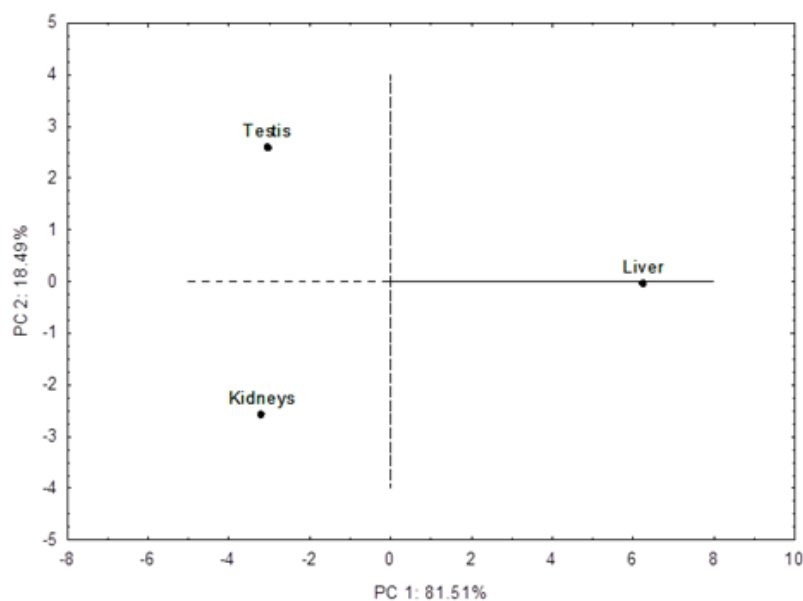
Element	Talasna dužina (nm)	Režim posmatranja plazme	$\text{Slope}_{\text{cal}}/\text{Slope}_{\text{sam}}$	ME (%)	r	Linearni opseg (mg/l)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
Al	167,079	aksijalni	/*	/*	0,99944	-	4,277	14,257
		radijalni	/*	/*	0,62834	-	5,720	18,723
	308,215	aksijalni	1,013	1.3	0,99998	0-100	0,067	0,225
		radijalni	0,877	-12.3	0,99901		0,730	2,435
	309,271	aksijalni	0,914	-8.6	0,99815	0-100	0,082	0,272
		radijalni	0,926	-7.4	0,99965		0,619	2,064
	396,152	aksijalni	1,062	6.2	0,99958	0-100	0,034	0,112
		radijalni	0,935	-6.5	0,99915		0,365	1,216

* kalibraciona kriva nije linearna

5.5. Sadržaj aluminijuma u uzorcima tkiva mužjaka Sprague-Dawley pacova

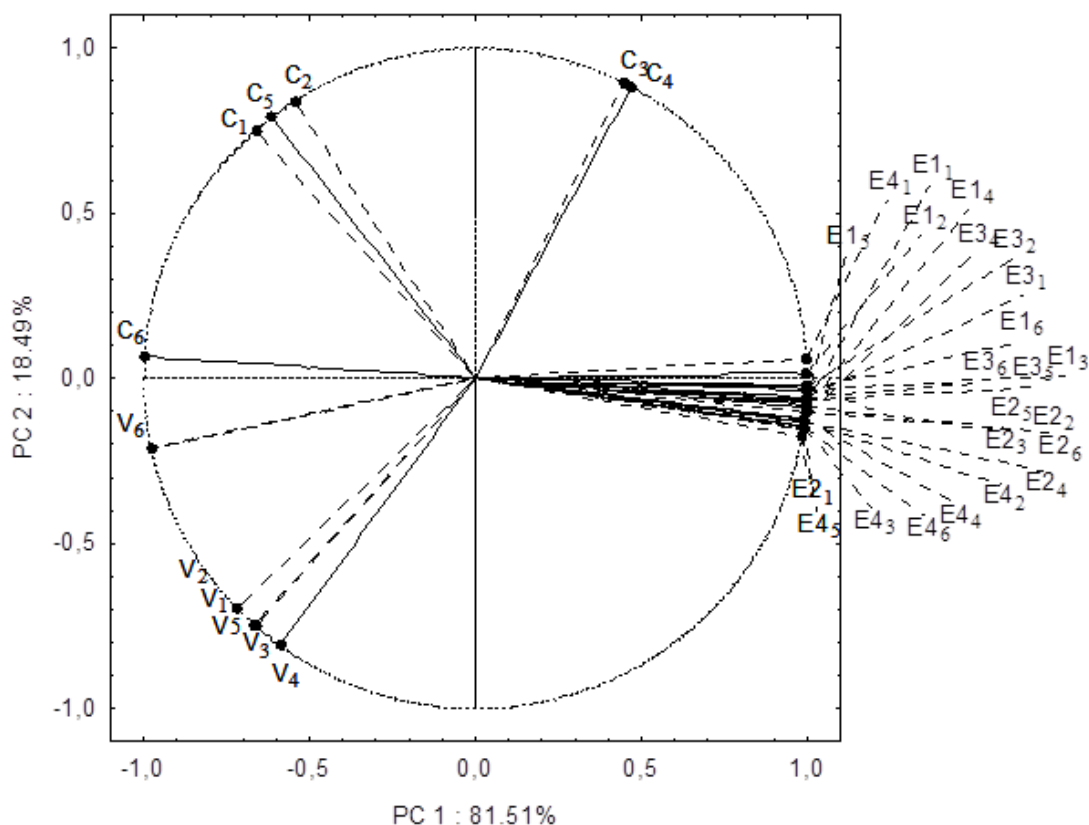
Akumulacija aluminijuma u jetri, bubrezima i testisima pacova nakon osam nedelja intraperitoneumske primene AlCl_3 data je u tabelama 11 i 12 i grafikonima 2, 3 i 4. Rezultati su izraženi u mikrogramima aluminijumja po gramu tkiva ($\mu\text{g/g}$). Upoređivanjem nivoa aluminijuma u tkivima eksperimentalnih pacova može se zaključiti da je najveća akumulacija detektovana je u jetri, a zatim u bubrezima i testisima. Ovi rezultati su očekivani, jer su bubrezi odgovorni za njihovo izlučivanje, pri čemu se aluminijum ne taloži na nivou bubrega.

Istovremeno, vremenski period od osam nedelja dovoljno je dug period da aluminijum može da se akumulira u tkivima jetre, bubrega i testisa.



Grafik 2. Glavna komponentna analiza tkiva u zavisnosti od količine akumuliranog aluminijuma

Količina aluminijuma u tri kontrolne grupe bila je u rasponu: 3,48-12,1 mg/g (jetra), 6,3-9,3 mg/g (bubrezi) i 5,6-16,6 mg/g (testisi). U uzorcima jetre utvrđena je značajna akumulacija Al. Količina Al u jetri pacova iz grupe E1, opsega od 218-356 mg/g, bile su i do dva puta veće od količina kod pacova iz grupe E3, u opsegu 154-235 mg/g, koji su prethodno tretirani verapamilom. Takođe, zabeležen je porast količina Al kod pacova iz grupe E2 (opseg 308-460 mg/g) u poređenju sa pacovima tretiranim verapamilom (E4), opsega 199-277 mg/g. Nakon aplikovanja $AlCl_3$ kod pacova, nađeni su niži nivoi Al u bubrezima i testisima. Kao i u slučaju jetre, količine Al u bubrezima i testisima pacova iz grupe E1 (raspon 36,6-52,3 mg/g i 18,7-44,1 mg/g respektivno), bile su i do dva puta više od količina kod pacova iz grupe E3 (raspon 25,5-44,1 mg/g, odnosno 14,2-18,9 mg/g) koji su prethodno tretirani verapamilom. Takođe, zabeležen je porast količine Al u bubrezima i testisima pacova iz grupe E2 (raspon 50,3-75,7 mg/g odnosno 30,1-67,6 mg/g) u poređenju sa pacovima tretiranim verapamilom (E4, raspon 46,1-63,2 mg/g, odnosno 18,6-27,5 mg/g). U poređenju sa kontrolnim grupama, količine aluminijuma u jetri, bubrezima i testisima pacova posle tretiranja sa $AlCl_3$ značajno su se razlikovale. Takođe, nakon primene verapamila, evidentirano je statistički značajno smanjenje količine aluminijuma u uzorcima E2 i E4 u odnosu na uzorke E1 i E3. Shodno rezultatima, stepen akumulacije zavisi od vrste tkiva, što je u vezi sa boljom bioraspoloživnošću aluminijuma iz laktata nego iz hlorida ili hidroksida.



Grafik 3. Komponenta analiza uzoraka tkiva u zavisnosti od akumuliranog aluminijuma

U tabeli 11 prikazani su rezultati uzoraka sa dodatkom poznate količine analita i merenja prinosa analitičkog postupka (*recovery test*) koji su bili između 91,8% i 108,4%. Rezultati *recovery* testa za uzorke jetre bili su između 91,8% i 99,5%, za uzorke bubrega između 95,4% i 107,3%, a za uzorke testisa između 95,1% i 108,4%, pri čemu je najniži rezultat dobijen za tkivo jetre.

U tabeli 12 prikazani su rezultati dobijeni poređenjem tkivne akumulacije aluminijuma (jetra, bubreg i testis) nakon hronične davanja $AlCl_3$ i efekat nakon upotrebe verapamila. U svim merenjima tkiva registrovan je statistički visoko značajan porast akumulacije aluminijuma u tkivu: jetre ($p < 0,001$), bubrega ($p < 0,001$) i testisa ($p < 0,001$), bez obzira na primenjenu dozu aluminijuma. Zaštitni efekat verapamila dobijen je u jetri ($p < 0,001$) i testisima ($p < 0,001$), bez obzira na dozu aluminijuma. Međutim, u bubrezima nije zabeležen zaštitni efekat verapamila. Analizirani rezultati prikazani su i na grafikonu broj 4.

Tabela 11. Koncentracija aluminijuma* ($\mu\text{g/g}$) u tkivu jetre, bubrega i testisa kod pacova nakon 8 nedelja intraperitoneumske administracije AlCl_3 i “recovery” test (%)

Grupa**	Tkivo jetre			Tkivo bubrega			Tkivo testisa		
	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD	RT***	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD	RT***	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD	RT***
C ₁	3.48±0.07 ^d	2.01	92.6	6.3 ±0.3 ^b	4.76	98.2	16.1±0.1 ^d	0.62	95.5
C ₂	6.3±0.1 ^d	1.59	96.4	6.5±0.1 ^b	1.54	97.3	9.1±0.1 ^d	1.10	96.6
C ₃	9.3±0.1 ^d	1.08	94.1	5.6±0.2 ^b	3.57	97.3	9.5±0.3 ^d	3.16	96.8
C ₄	12.8±0.1 ^d	0.78	98.4	9.3±0.1 ^b	1.08	97.6	13.1±0.3 ^d	2.29	101.6
C ₅	8.5±0.1 ^d	1.18	95.7	9.8±0.3 ^b	3.06	96.8	16.6±0.7 ^d	4.22	103.0
C ₆	2.75±0.02 ^d	0.73	92.3	8.9±0.1 ^b	1.12	96.7	9.3±0.1 ^d	1.08	97.5
E1 ₁	309±1 ^b	0.32	97.2	51±1 ^a	1.96	102.0	30.6±0.7 ^{abc}	2.29	98.8
E1 ₂	271±3 ^b	1.11	96.6	36.7±0.3 ^a	0.82	99.4	43.6±0.5 ^{abc}	1.15	99.6
E1 ₃	333±2 ^b	0.60	96.3	38.3±0.4 ^a	1.04	98.9	29.5±0.8 ^{abc}	2.71	100.7
E1 ₄	239±2 ^b	0.84	93.9	36.6±0.2 ^a	0.55	99.2	18.7±0.1 ^{abc}	0.53	96.1
E1 ₅	356±3 ^b	0.84	95.6	41.7±0.7 ^a	1.68	96.2	20.3±0.1 ^{abc}	0.49	95.9
E1 ₆	233±1 ^b	0.43	91.9	49.5±0.4 ^a	0.81	98.0	44.1±0.5 ^{abc}	1.13	102.6
E2 ₁	218±1 ^c	0.46	92.2	52.3±0.4 ^a	0.76	99.5	17.6±0.6 ^{bcd}	3.41	95.9
E2 ₂	181±1 ^c	0.55	91.8	38.7±0.7 ^a	1.81	96.0	18.6±0.4 ^{bcd}	2.15	96.8
E2 ₃	235±1 ^c	0.42	95.8	38.9±0.5 ^a	1.29	107.3	17.4±0.4 ^{bcd}	2.30	98.1
E2 ₄	216±1 ^c	0.46	97.7	44.1±0.2 ^a	0.45	105.3	18.9±0.6 ^{bcd}	3.17	97.1
E2 ₅	165±1 ^c	0.61	99.5	26.3±0.4 ^a	1.52	96.2	18.1±0.1 ^{bcd}	0.55	96.0
E2 ₆	154±1 ^c	0.65	95.6	25.5±0.3 ^a	1.18	102.2	14.2±0.3 ^{bcd}	2.11	98.2
E3 ₁	445±5 ^a	1.12	98.8	36.2±0.5 ^a	1.38	97.1	16.1±0.1 ^a	0.62	97.3
E3 ₂	361±5 ^a	1.39	96.1	55.0±0.4 ^a	0.73	101.9	48.1±0.4 ^a	0.83	105.0
E3 ₃	418±2 ^a	0.48	98.7	55.3±0.4 ^a	0.72	98.1	51.8±0.7 ^a	1.35	105.1
E3 ₄	460±2 ^a	0.43	97.2	82.2±0.6 ^a	0.73	100.6	30.1±0.6 ^a	1.99	95.9
E3 ₅	439±4 ^a	0.91	97.7	54.7±0.8 ^a	1.46	99.5	30.5±0.5 ^a	1.64	95.6
E3 ₆	308±4 ^a	1.3	95.0	60.5±0.3 ^a	0.50	104.1	47.2±0.5 ^a	1.06	96.9
E4 ₁	274±2 ^{bc}	0.73	93.8	50.3±0.4 ^a	0.79	101.0	67.6±0.2 ^{ab}	0.29	108.0
E4 ₂	253±2 ^{bc}	0.79	98.0	67.6±0.2 ^a	0.3	102.1	39.9±0.5 ^{ab}	1.25	103.7
E4 ₃	235±1 ^{bc}	0.43	99.3	75.7±0.2 ^a	0.26	96.3	27.5±0.2 ^{ab}	0.73	108.4
E4 ₄	277±5 ^{bc}	1.81	94.5	56.2±0.4 ^a	0.71	97.2	25.2±0.6 ^{ab}	2.38	98.8
E4 ₅	269±2 ^{bc}	0.74	95.0	62.1±0.4 ^a	0.64	102.7	26.1±0.4 ^{ab}	1.53	99.6
E4 ₆	199±3 ^{bc}	1.51	94.4	49.1±0.3 ^a	0.61	98.3	23.7±0.6 ^{ab}	2.53	97.4

Grupa**	Tkivo jetre			Tkivo bubrega			Tkivo testisa		
	$c_{sr} \pm SD$	RSD	RT***	$c_{sr} \pm SD$	RSD	RT***	$c_{sr} \pm SD$	RSD	RT***
V ₁	11.6±0.2 ^d	1.72	92.4	46.3±0.3 ^a	0.65	96.4	18.6±0.4 ^{cd}	2.15	96.3
V ₂	2.3±0.1 ^d	4.35	98.5	63±1 ^a	1.59	97.7	19.0±0.4 ^{cd}	2.11	95.9
V ₃	7.9±0.1 ^d	1.27	97.7	67.5±0.3 ^a	0.44	101.3	14.1±0.3 ^{cd}	2.13	97.0
V ₄	2.15±0.03 ^d	1.40	95.4	46.0±0.2 ^a	0.43	99.6	6.6±0.3 ^{cd}	4.76	98.6
V ₅	8.1±0.1 ^d	1.23	97.6	46.2±0.2 ^a	0.43	98.4	15.6±0.6 ^{cd}	3.85	95.1
V ₆	5.1±0.2 ^d	3.92	92.9	6.41±0.03 ^a	0.47	95.4	6.1±0.2 ^{cd}	3.28	99.1

*vrednosti su prosečne ± SD (n = 3). Vrednosti koje su obeležene različitim slovima unutar kolona statistički se razlikuju pri p < 0,05 Takijevim testom

**n=6 po grupi; C- kontrolna grupa, fiziološki rastvor i.p.; E1-10 mg/kg telesne mase AlCl₃ i.p.; E2-5 mg/kg telesne mase, verapamila pomoću sonde, i nakon 60 minuta 10 mg/kg telesne mase AlCl₃ i.p.; E3-20 mg/kg telesne mase AlCl₃ i.p.; E4-5 mg/kg telesne mase verapamila pomoću sonde, i nakon 60 minuta 20 mg/kg telesne mase AlCl₃ i.p.; V-5 mg/kg telesne mase verapamila pomoću sonde.

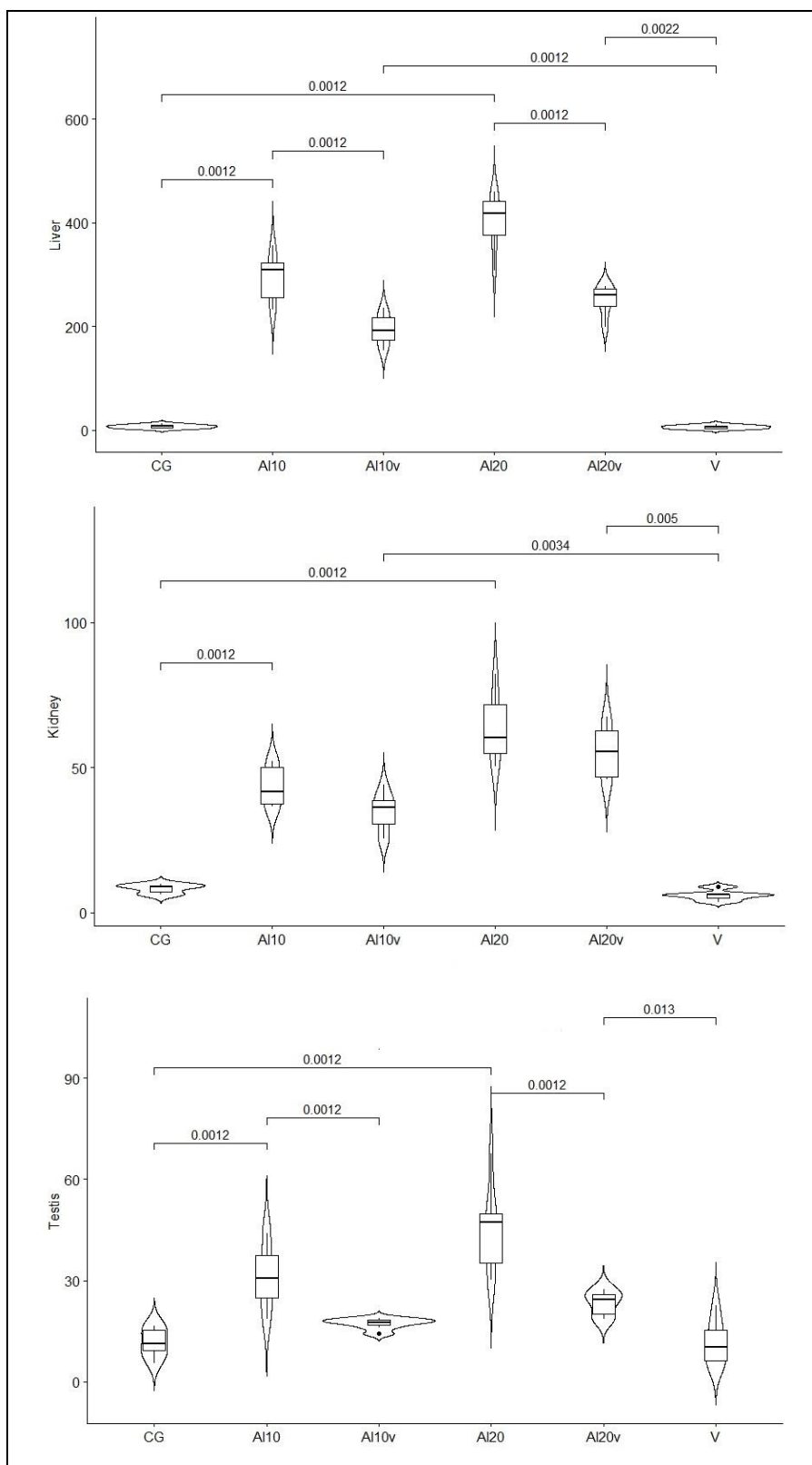
***RT-Recovery test

Tabela 12. Tkivne akumulacije aluminijuma nakon hronične administracije AlCl₃ kod Sprague-Dawley pacova

Tkivo/grupa	Jetra (µg/g)	Bubreg (µg/g)	Testis (µg/g)
K	7,18±3,78	8,38±1,56	11,63±4,36
V	6,19±3,70	6,05±1,78	11,80±6,79
E1	293,24±46,86 ^{a,b}	43,70±9,96 ^{a,b}	31,14±9,91 ^{a,b}
E2	403,29±53,92 ^{a,b,c,d}	63,76±11,85 ^{a,b,c,d}	45,01±13,10 ^{a,b,c,d}
E3	194,44±29,80 ^{a,b,c}	34,91±6,80 ^{a,b}	17,27±1,63 ^{a,b,c}
E4	251,17±29,98 ^{a,b,c,d,e}	55,65±9,60 ^{a,b,c,d}	23,35±3,74 ^{a,b,c,d,e}
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, p<0,05

^avs K, ^bvs V, ^cvs E1, ^evs E2, ^dvs E3.



Grafik 4. Poređenje hronične administracije AlCl₃, tkivne akumulacije i nakon davanja verapamila

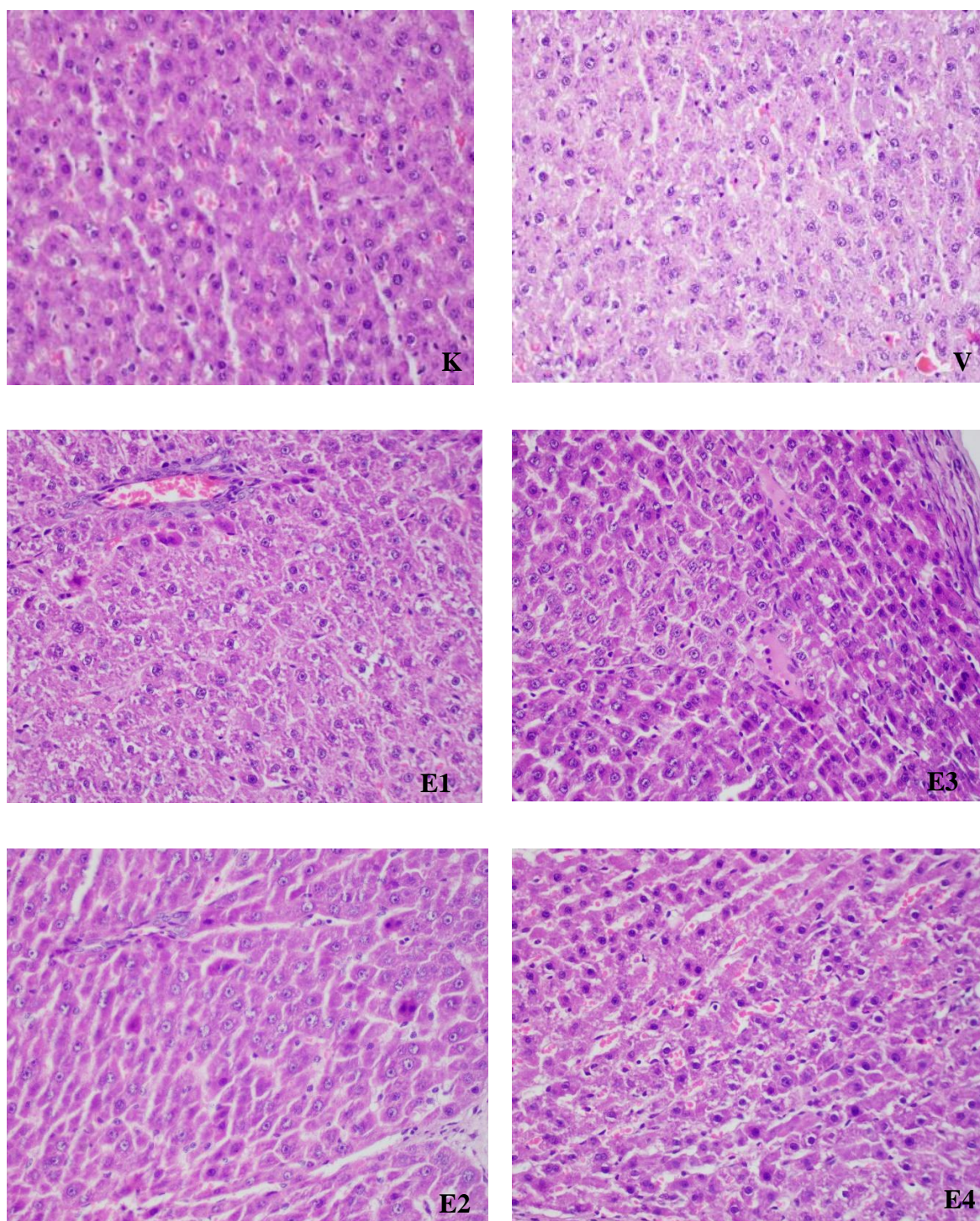
5.6. Patohistološka i imunohistohemijska analiza tkiva jetre testiranih Sprague-Dawley pacova

Mikroskopskim pregledom jetre kontrolne grupe i grupa tretiranih verapamilom nađena je normalna histološka građa lobulusa jetre. U grupama pacova koje su tretirane $AlCl_3$ (grupe E1 i E2) dokazane su značajne morfološke promena u građi jetre, koje uključuju gubitak normalnog izgleda gredica hepatocita, degeneraciju, koagulacionu nekrozu pojedinačnih hepatocita što je praćeno piknozom jedara ili njihovim iščezavanjem, prisustvo masne promene u pojedinim hepatocitima sa pojavom okrugle svetle vakuole u citoplazmi, pojava zapaljenskog infiltrata koga čine pretežno limfociti, kao i dilataciju sinusoida. Fokusi masne promene prisutni su samo u grupi E2 (tabela 13, slika 5). Nakon pretretmana sa verapamilom kod životinja koje su tretirane $AlCl_3$, došlo je do redukcije morfoloških promena koje su bile od slabog do umerenog stepena (slika 5)

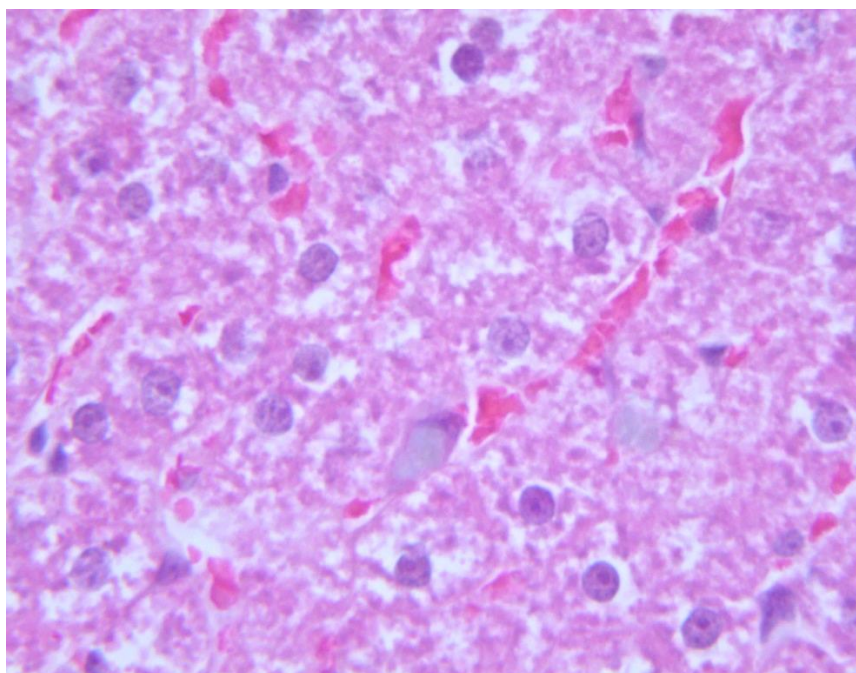
Tabela 13. Patohistološke promene u jetri Sprague-Dawley pacova nakon tretmana različitim dozama aluminijuma i premedikacije verapamilom

Grupe/ promena	Degeneracija	Piknoza jedara	Zapaljenje	Dilatacija sinusoida	Masna promena	Poremećaj arhitektonike
K	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-
E1	++	++	++	+ / ++	+ / -	+
E2	+++	+++	+++	++	+	++
E3	+	+	+	+	+ / -	-
E4	++	++	++	+	+ / -	+

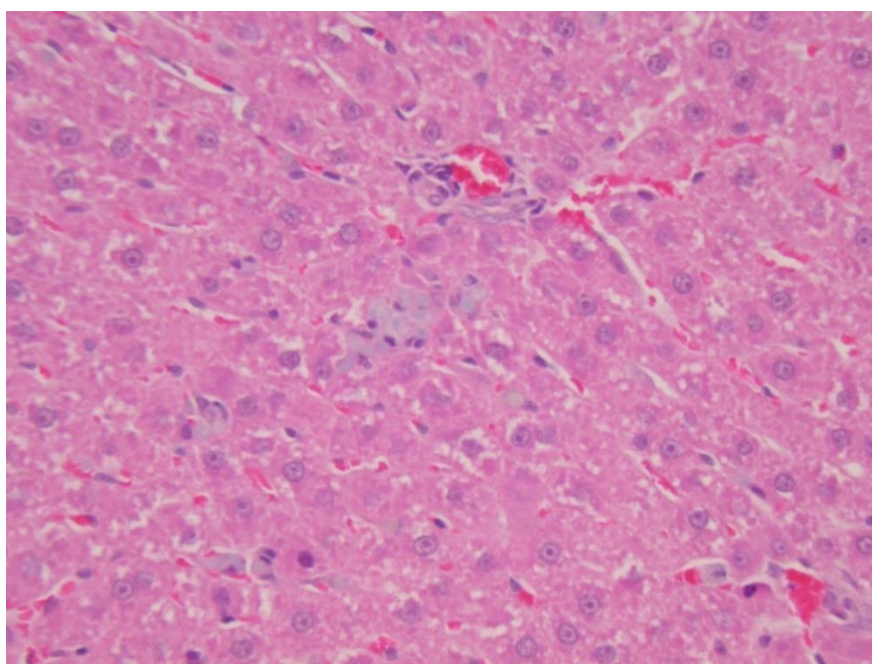
U perisinusoidalnim prostorima zapažaju se, u vidu intracelularnih depozita, amorfnog do sitnozrnastog izgleda, slabo bazofilne kolorisanosti, egzogeni pigmenti, odnosno depoi metalizovanog aluminijuma. Po položaju (perisinusoidalno) i po morfologiji, najčešće se vidi po jedna ćelija, u kojoj ova inkluzija preovladava i potiskuje ostatak protoplazme periferno, tako da je i jedro komprimovanog izgleda, heterohromatično (slika 6). U pitanju su Ito ćelije (stelatni fibroblasti) jetre, ali se ne uočava akumulacija makrofaga (zbog položaja i distribucije). Ovi depoziti su mestimično grupisani, ali uvek kao struktura zasebnog, okruglog ili ovalnog oblika, koje se kao inkluzije nalaze unutar ćelija (slika 7). Takve grupe su okružene zapaljenskim ćelijama koje stvaraju utisak „granulomatozne“ reakcije prema deponovanom materijalu (slika 8).



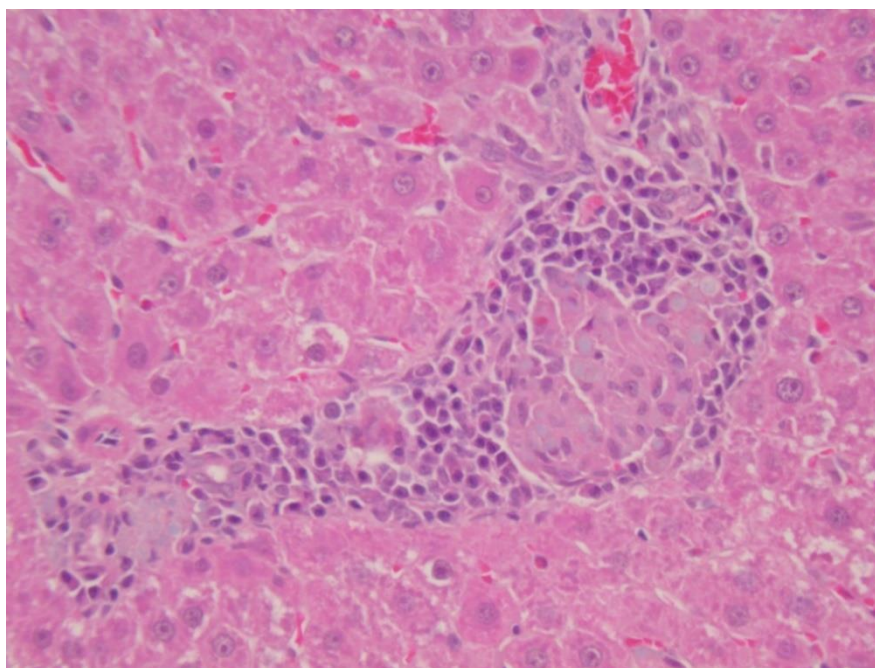
Slika 5. Morfološke promene u tkivu jetre. Regularna morfologija lobulusa jetre (K i V); degenerativne promene u hepatocitima umerenog stepena i zapaljenski infiltrat oko vene centralis (E1); koagulaciona nekroza sa piknozom jedara, degeneracija hepatocita i prošireni sinusoidi (E2); degeneracija i nekroza slabog stepena i masna promena u pojedinim hepatocitima (E3); degeneracija, nekroza i dilatacija sinusoida umerenog stepena (E4) (H&E x 600).



Slika 6. Depoziti aluminijuma perisinusoidalne lokalizacije u centru se prezentuje kao jedan intracelularni deponit sa jedrom komprimovanog izgleda i dva manja deponita desno. Hepatociti pokazuju izrazite degenerativne promene (Grupa E2) (H&E x 800).



Slika 7. Inkluzije unutar pojedinačnih ili manjih grupa hepatocita (grupa E2)(H&Ex 400)

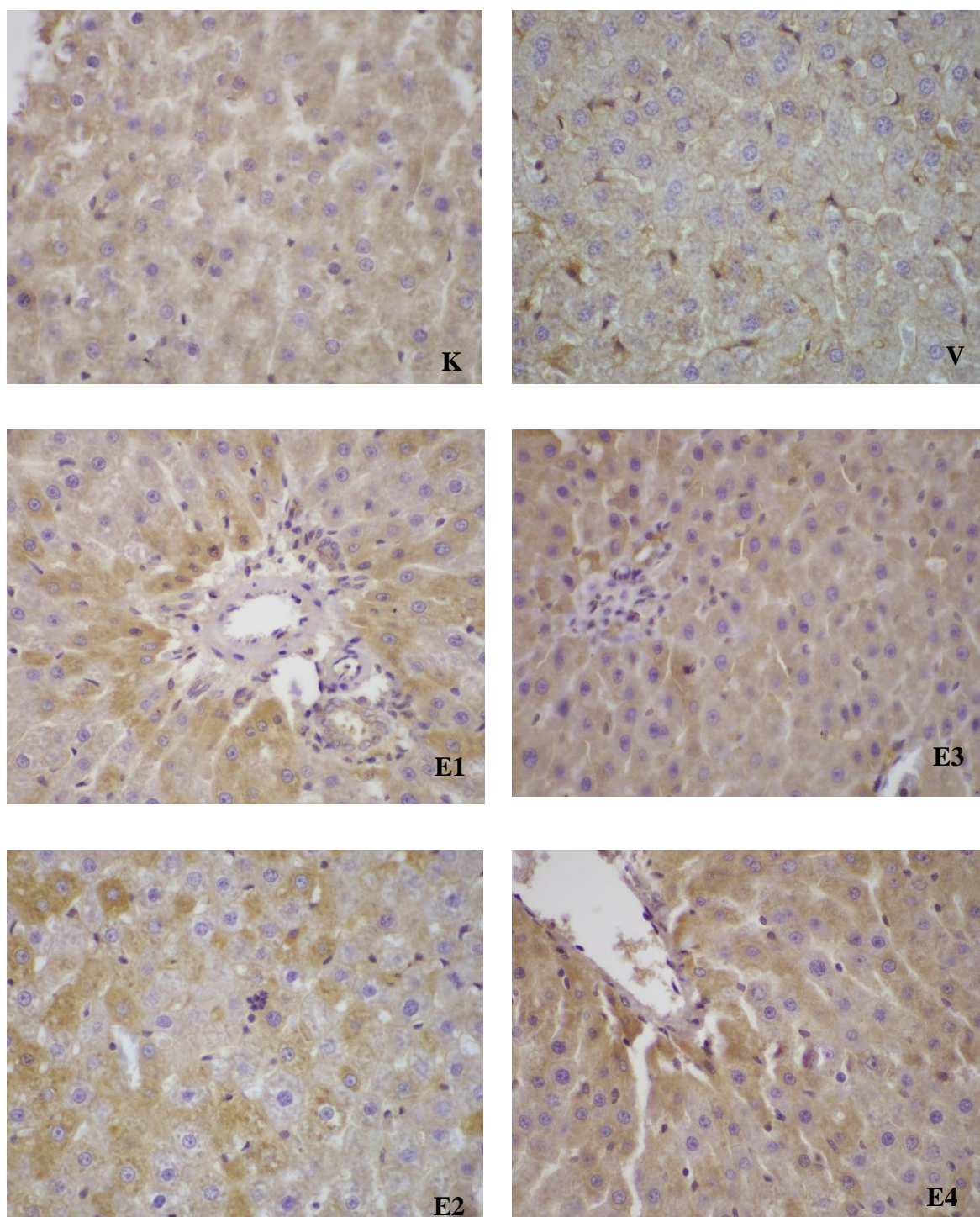


Slika 8. Snažna zapaljenska reakcija na aluminijumske depozite unutar vezivnog tkiva Kirnanovog prostora (Grupa E2) (H&E x 400)

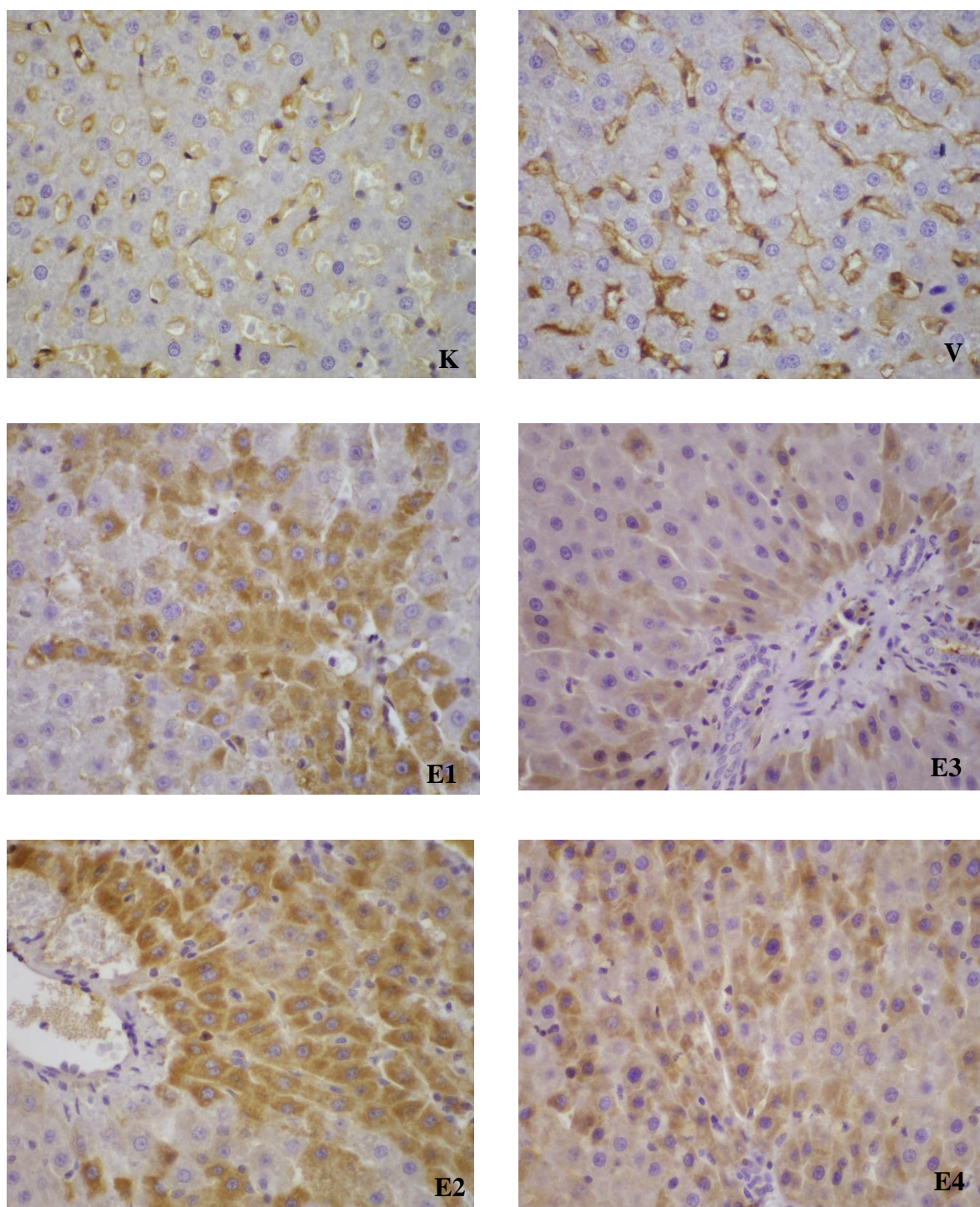
Imunohistohemijska analiza ekspresije apoptotskih proteina familije Bcl-2 pokazala je da hepatociti kontrolne grupe i grupe koja je tretirana samo verapamilom pokazuju snažnu citoplazmatsku pozitivnost na Bcl-2, dok je nalaz proapoptotskih markera bio negativan. Nakon tretmana životinja visokim dozama $AlCl_3$ došlo je do redukcije ekspresije Bcl-2 koja je bila odsutna ili vrlo blaga, dok su proapoptotski markeri Bax i Bid pokazivali snažnu imunsku reakciju u hepatocitima, naročito u grupi koja je primila 20mg $AlCl_3$ (E2). Nakon primene verapamila kod životinja koje su primale $AlCl_3$ (E3 i E4) došlo je do blage redukcije ekspresije proapoptotskih markera, dok je ekspresija antiapoptotskog Bcl-2 bila slaba (tabela 14, slike 9, 10 i 11).

Tabela 14. Imunohistohemijska ekspresija apoptotskih proteina Bcl-2 familije u jetri nakon tretmana različitim dozama aluminijuma i premedikacije verapamilom

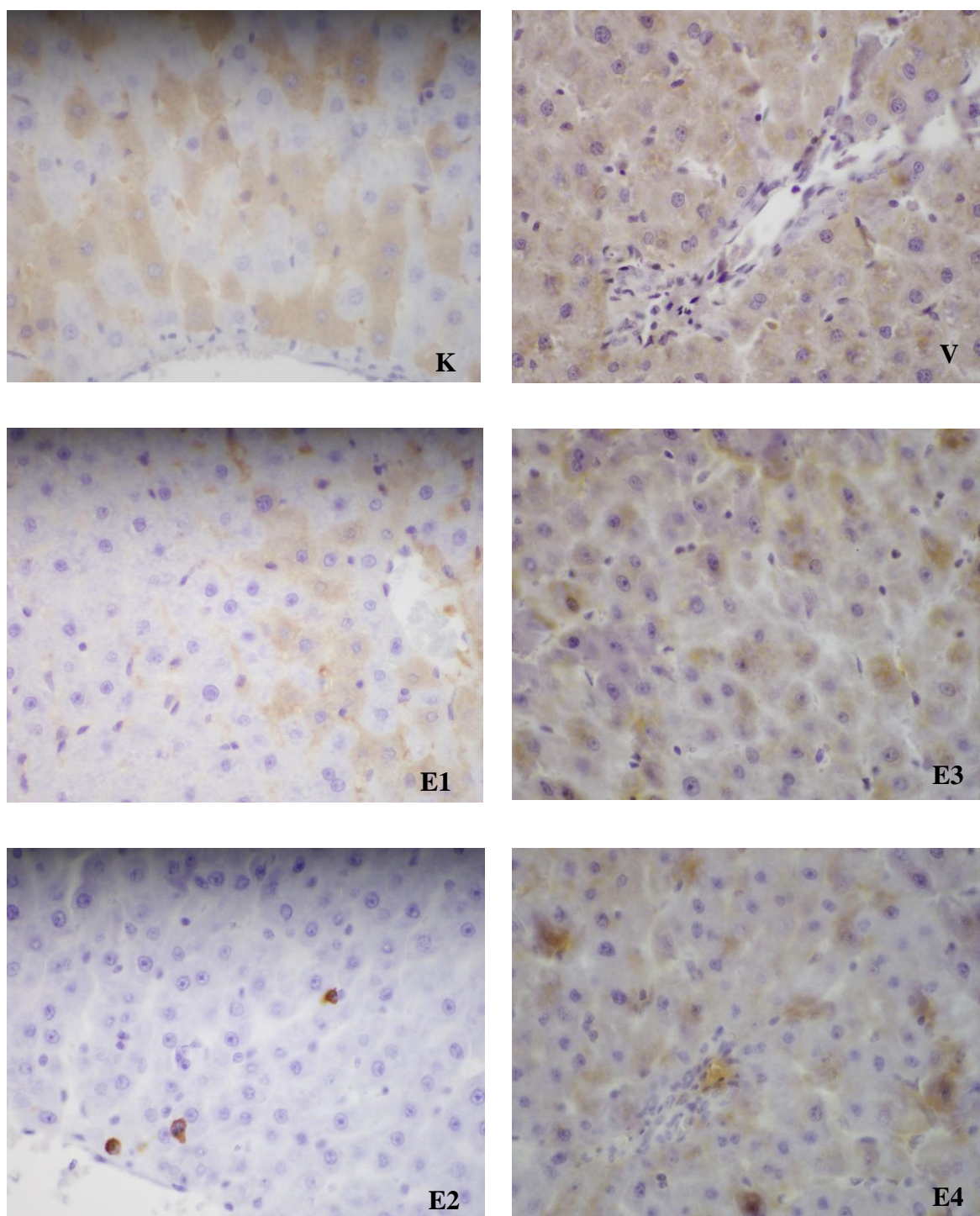
Grupa	Bax	Bid	Bcl-2
K	-	-	+++
V	-	-	+++
E1	++	++	+/-
E2	+++	+++	-
E3	+ / +++	+ / +++	+
E4	++	++	+/-



Slika 9. Imunohistohemijska ekspresija Bax u tkivu jetre. Negativan nalaz (K i V); umerena imunoreaktivnost (E1); snažno citoplazmatsko prebojavanje u većem broju hepatocita (E2); redukcija citoplazmatske ekspresije (E3 i E4) (x600)



Slika 10. Imunohistohemijska ekspresija Bid u tkivu jetre. Negativan nalaz (K i V); umerena imunoreaktivnost (E1); snažno citoplazmatsko prebojavanje (E2); redukcija citoplazmatske ekspresije (E3 i E4) (x 600)



Slika 11. Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u tkivu jetre. Normalna ekspresija Bcl-2 (K i V); slaba (E1); negativan nalaz (E2); slaba imunoreaktivnost (E3 i E4) (x 600)

5.7. Analiza morfometrijskih parametara tkiva testisa pacova Sprague-Dawley

U tabeli 15 prikazani su rezultati dobijeni poređenjem morfometrijskih parametara tkiva testisa eksperimentalnih životinja, izraženi u procentima. Statistička značajnost verifikovana je u sledećima parametrima: debljini intersticijuma ($p=0,044$), bazalnog stratuma ($p<0,001$), stepenu degeneracije ($p<0,001$), adlumeni ($p=0,002$) i prisustvu edema ($p<0,001$).

Tabela 15. Poređenje površinske gustine ispitivanih parametara u tkivu testisa nakon hronične administracije aluminijum hlorida i efekat nakon upotrebe verapamila

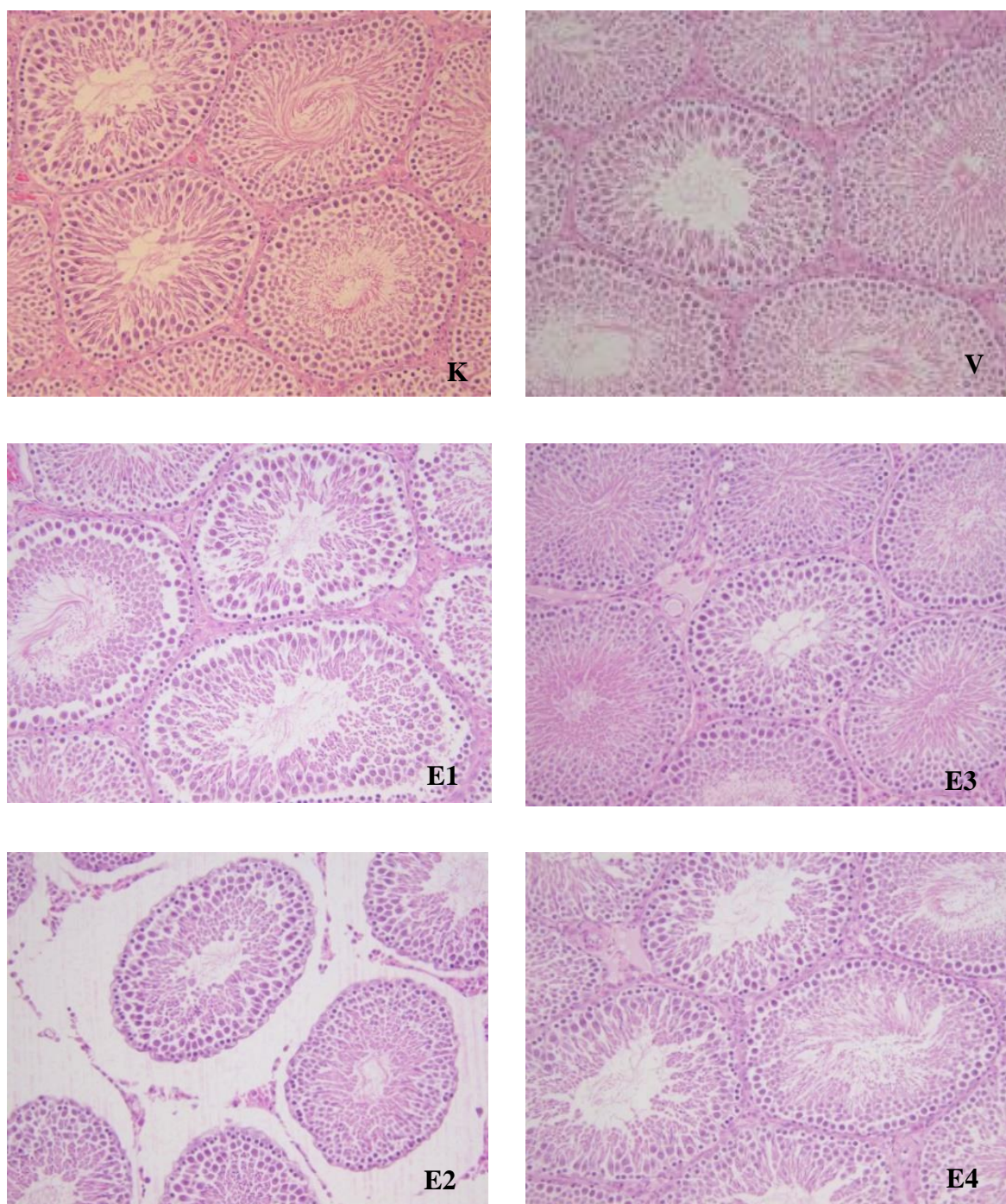
G	Intersticijum	Bazalni	Stepen	Adlumen	Lumen	Prisustvo
		stratum	degeneracije			edema
K	7,72±0,75	14,51±1,12	0±0	63,43±3,19	14,35±4,49	0±0
V	7,41±1,31	13,89±1,31	0±0	63,58±2	15,12±2,39	0±0
E1	7,1±0,96	10,49±1,62 ^{a,b}	3,86±1,48 ^{a,b}	65,43±3,73	10,8±3,45	2,32±0,97 ^{a,b}
E2	10,96±2,84 ^{b,c}	6,79±1,26 ^{a,b,c}	19,45±8,05 ^{a,b,c}	43,98±7,79 ^{a,b,c}	15,9±3,77	2,94±2,37 ^{a,b}
E3	8,64±3,19	12,65±2,73	2,78±1,01 ^{a,b}	60,19±3,97 ^c	14,81±2,19 ^c	0,93±1,17
E4	10,34±2,58 ^{a,b}	10,18±2,27 ^{a, b, e}	5,09±2,25 ^{a,b,e}	62,5±4,86 ^e	10,65±4,71	1,24±0,48 ^{a,b}
p	0,044	<0,001	<0,001	0,002	0,193	<0,001

Srednja vrednost±SD za šest životinja u svakoj grupi, $p<0,05$

^avs K, ^bvs B, ^cvs E1, ^evs E2

5.8. Patohistološka i imunohistohemijska analiza tkiva testisa testiranih Sprague-Dawley pacova

Mikroskopskim pregledom testisa kontrolne grupe i grupe tretirane verapamilom nađena je normalna histološka građa seminifernih tubula i intersticijskog tkiva testisa. Grupe pacova koje su tretirane AlCl₃ (grupe E1 i E2) pokazivale su značajne morfološke promena u spermatogenezi, tj. prisutna je redukcija spermatogeneze, zastoj u sazrevanju na nivou spermatida, pri čemu su spermatozoidi bili odsutni u seminiferim kanalicima ili su registrovani retki i fragmentisani. Germinativni epitel je pokazivao prisustvo vakuolarne degeneracije u citoplazmi, kao i dezorganizaciju polnih ćelija. Intersticijum testisa pokazao je prisustvo edema, hiperemiju krvnih sudova, kao i hiperplaziju Lejdigovih ćelija, uz prisustvo



Slika 12. Morfološke promene u tkivu testisa. E1 (10mg) i E2 (20mg) degeneracija i dezorganizacija germinativnog epitela, redukcija spermatogeneze i edem intersticijuma koji je izražen u E2; E3 (V+10mg) i E4 (V+20mg) redukcija oštećenja germinativnog epitela i smanjene intersticijalnog prostora; V (verapamil) i K (kontrola) pokazuju regularnu morfologiju testisa (H&E x 200)

diskretnih degenerativnih promena u citoplazmi. Ove morfološke promene u seminiferim tubulima i intersticijumu testisa su izrazitije u grupi E2 koja je tretirana sa 20 mg $AlCl_3$ u poređenju sa

grupom E1 koja je tretirana sa 10mg AlCl₃ (tabele 16 i 17, slika 12). Grupe životinja koje su tretirane verapamilom i AlCl₃ (E3 i E4) pokazale su manje izražene napred opisane promene, uz poboljšanje spermatogeneze, ali još uvek je bila prisutna redukcija spermatogeneze, vakuolarna degeneracija, dezorganizacija polnih ćelija, kao i intersticijski edem (tabele 16 i 17, slika 12).

Tabela 16. Patohistološke promene u testisima Sprague-Dawley pacova nakon tretmana različitim dozama aluminijuma i premedikacije verapamilom

Grupe/ promena	Redukcija spermatogeneze	Vakuolarna degeneracija	Dezorganizacija germinativnog epitela	Zadebljanje tunike albuginee
K	-	-	-	-
V	-	-	-	-
E1	+	+	-	-
E2	+++	+++	+++	+
E3	-	-	-	-
E4	++	++	++	+

Toksični efekti malih doza AlCl₃ (grupe E1 i E3) doveli su do smanjenja spermatogeneze i degeneracije epitela polnih ćelija, ali u manjem intenzitetu u poređenju sa grupama sa većim dozama aplikovanog aluminijum hlorida (E2 i E4).

Tabela 17. Patohistološke promene u testisima Sprague-Dawley pacova nakon tretmana različitim dozama aluminijuma i premedikacije verapamilom

Grupe/ promena	Hiperplazija Lejdigovih ćelija	Degeneracija Lejdigovih ćelija	Intersticijski edem	Hiperemija
K	-	-	-	-
V	-	-	-	-
E1	-	-	-	-
E2	++	+	+++	++
E3	-	-	-	-
E4	+	-	++	++

Dezorganizacija polnih ćelija, zadebljanje tunike albuginee i hiperplastične promene u Lejdigovim ćelijama evidentirani su samo u grupi E2. Grupe eksperimentalnih životinja koje su tretirane manjom dozom AlCl₃, i pretretirane verapamilom (E3 i E4) pokazale su rezoluciju morfoloških promena, naročito u grupi E3.

Imunohistohemijska analiza ekspresije apoptotskih proteina iz familije Bcl-2 pokazala je da mejotska ćelije u citoplazmi ekspimiraju proapoptotski protein Bax u grupama koje su tretirane AlCl₃ (10 i 20mg), kao i veći nivo ekspresije proapoptotskog proteina Bid u grupi E2 (20mg AlCl₃), što ukazuje na povećanu apoptotsku aktivnost, naročito grupe tretirane sa 20mg AlCl₃. Ekspresija Bid proteina registrovana je u postmejotskim ćelijama germinativnog epitela svih ispitivanih grupa. Ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 nije verifikovana u germinativnom epitelu, dok je prisutna u Lejdig-ovim ćelijama svih ispitivanih grupa. Lejdigove ćelije pokazuju veći nivo ekspresije Bax i Bid, posebno u grupi E2 (20mg AlCl₃). Nakon pretretmana sa verapamilom došlo je do smanjenja ekspresije proapoptotskih proteina, Bax i Bid u premejotskim ćelijama germinativnog epitela i u Lejdigovim ćelijama, što je bilo evidentno u grupama E3 i E4 (tabele 18 i 19, slike 13, 14 i 15).

Tabela 18. Ekspresija proapoptotskih proteina Bax i Bid u tkivu testisa pacova

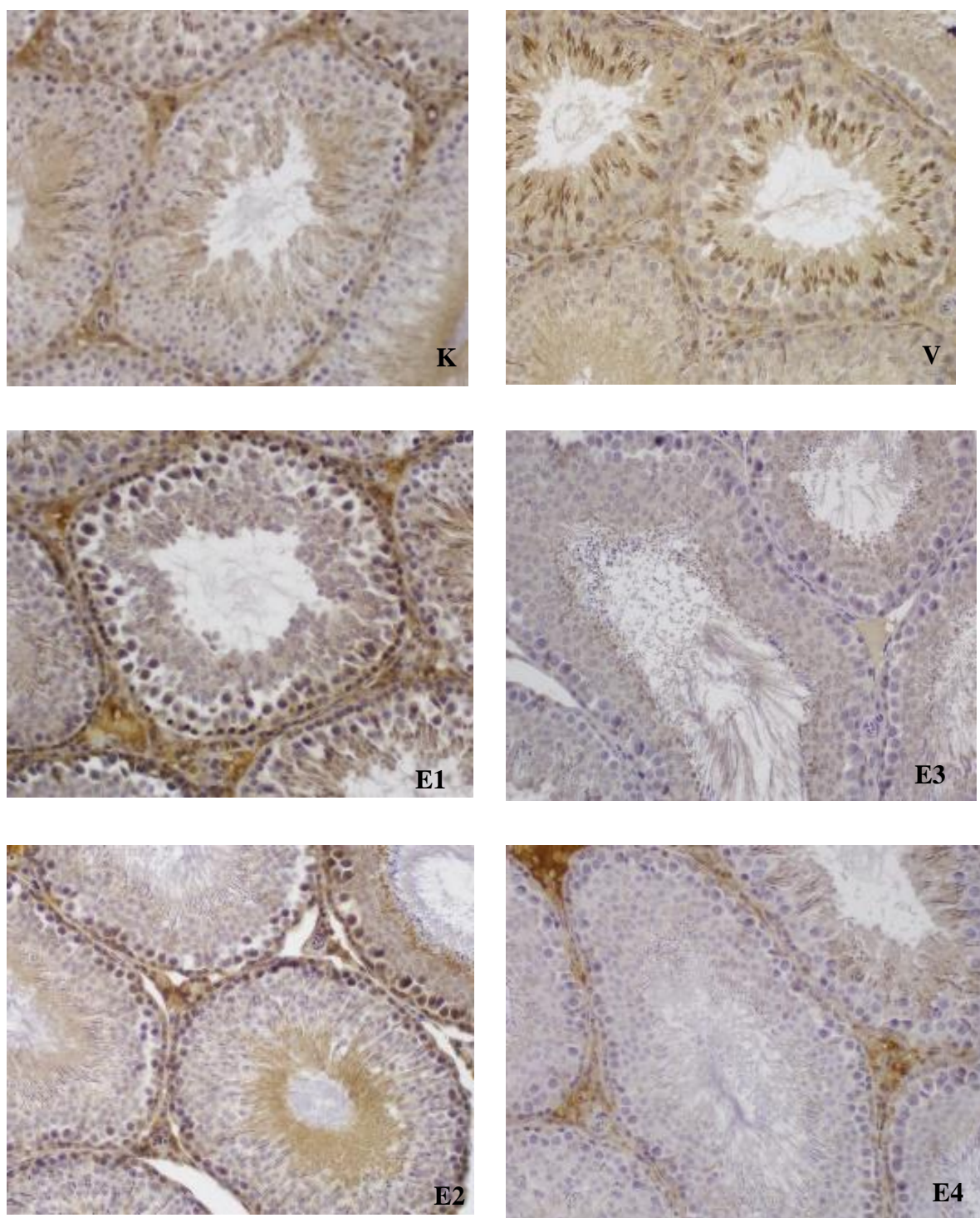
Grupa/ Bcl2	Bax PRMĆ	Bax MĆ	Bax POMĆ	Bax LĆ	Bid PRMĆ	Bid MĆ	Bid POMĆ	Bid LĆ
K	-	+++	-	+	-	-	+	+
V	-	+++	-	+	-	-	+	+
E1	-	+++	-	+	-	-	+	+
E2	++	+++	-	++	+	-	+	++
E3	-	+++	-	+			+	+
E4	+	+++	-	+	-	-	+	++

PRMĆ: premejotske ćelije; MĆ: mejotske ćelije; POMĆ; postmejotske ćelije;
LĆ; Lejdigove ćelije

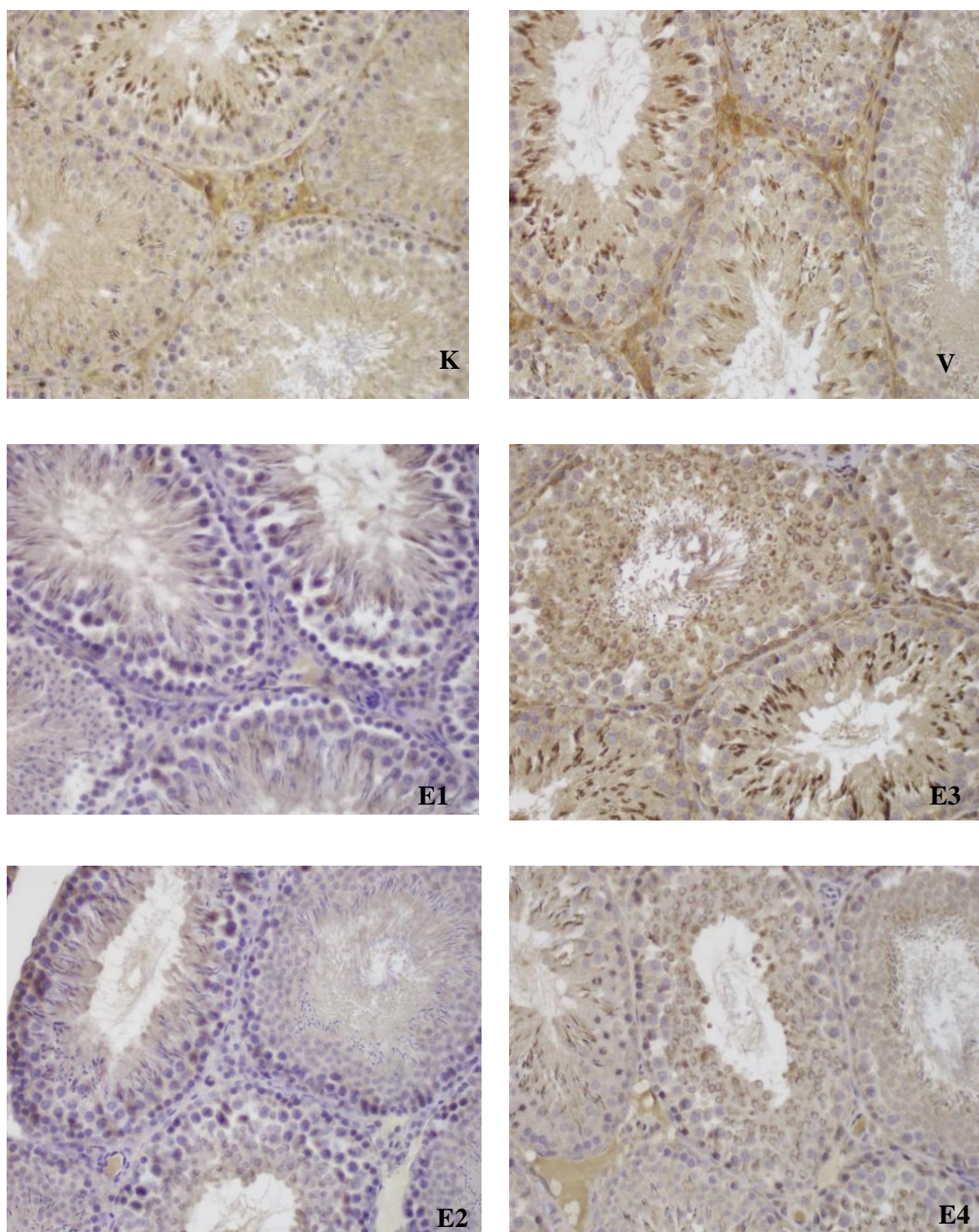
Tabela 19. Ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 u tkivu testisa pacova

Grupa/ Bcl2	Bcl-2 PRMĆ	Bcl-2 MĆ	Bcl-2 POMĆ	Bax LĆ	Bcl-2 LĆ
K	-	-	-	+	+
V	-	-	-	+	+
E1	-	-	-	+	+
E2	-	-	-	++	+
E3	-	-	-	+	+
E4	-	-	-	+	+

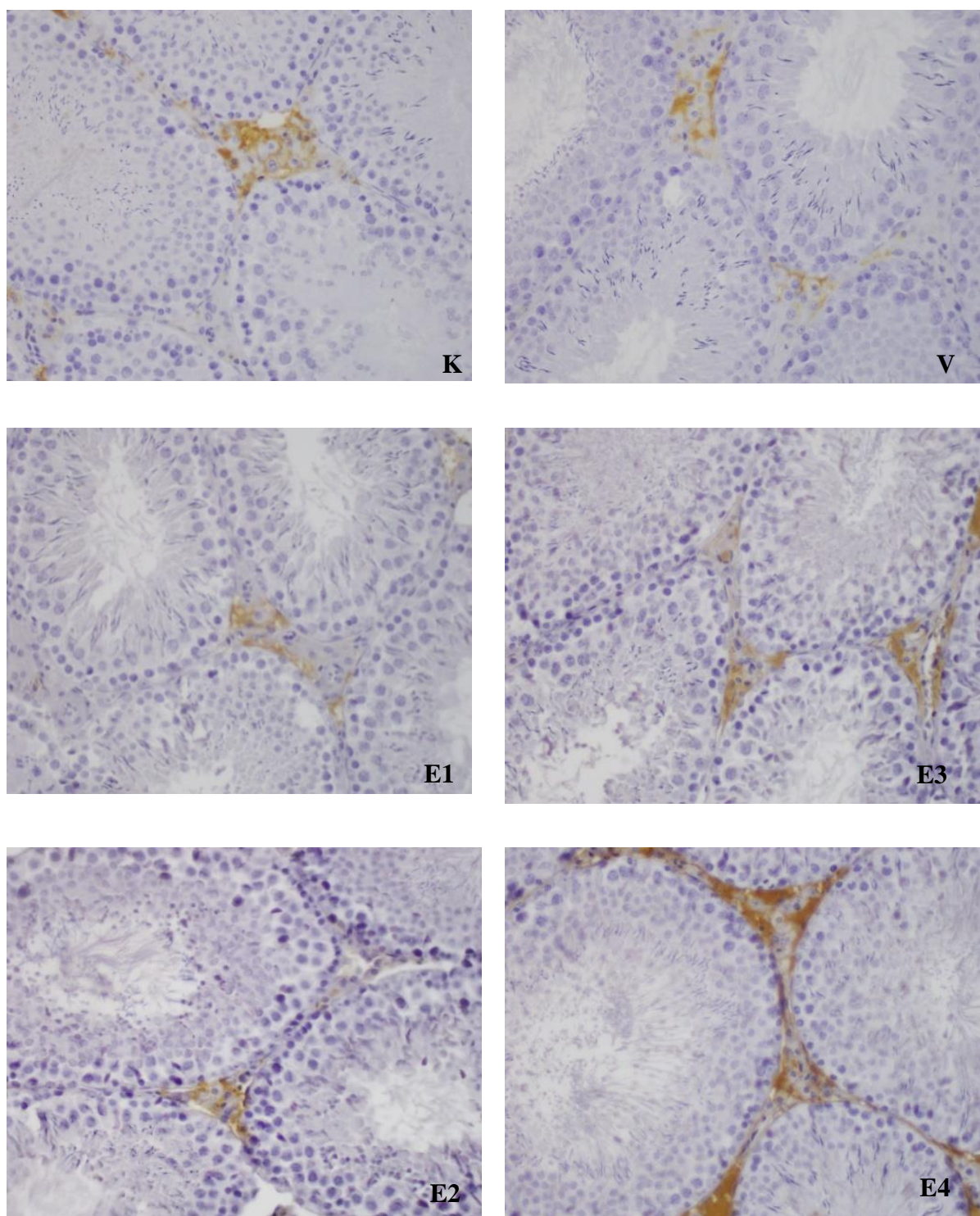
PRMĆ: premejotske ćelije; MĆ: mejotske ćelije; POMĆ; postmejotske ćelije;
LĆ; Lejdigove ćelije



Slika 13. Imunohistohemijska ekspresija Bid u tkivu testisa: slaba imunoreaktivnost je prisutna u premejotskim ćelijama germinativnog epitela grupe E2 (20mg) (x 200)



Slika 14. Imunohistohemijska ekspresija Bax u tkivu testisa: slaba do umerena imunoreaktivnost je prisutna u premejotičkim ćelijama germinativnog epitela grupe E1 i E2 kao i u grupi E4 koja je imala pretretman sa verapamilom (x200)



Slika 15. Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u tkivu testisa: slaba imunoreaktivnost prisutna je u citoplazmi Leydig-ovih ćelija svih ispitivanih grupa (x200)

6.0. DISKUSIJA

6.1. Hematološko-biohemijske i tkivne promene tretiranih životinja pre i nakon administracije verapamila

U ovoj studiji dokazano je da primena verapamila značajno umanjuje akumulaciju aluminijuma u tkivima (jetre, testisa, bubrega) i ublažava hematološke posledice intoksikacije izazvane aluminijumom. Ovi rezultati sugerišu da bi verapamil mogao da se koristi u protektivne svrhe protiv toksičnosti izazvane AlCl_3 . Dodatni rezultat istraživanja je da premedikacija verapamilom nije značajno uticala na smanjenje parametara inflamacije. Patogenetski mehanizmi intoksikacije aluminijumom najverovatnije su, makar jedim delom, drugačije patogeneze i ne mogu biti sprečeni blokiranjem Ca^{2+} kanala.

Aluminijum se, nakon ingestije, vezuje za serumske anjonske transportere, transferin i citrat, koji omogućavaju njegov prolazak kroz biološke barijere (206). U eksperimentima na pacovima otkriveno je da oralni unos aluminijuma dovodi do značajne akumulacije ovog metala u jetri, slezini, bubrezima i kostima i u manjoj meri u mišićima, mozgu, plućima i srcu. Nakon deponovanja, aluminijum deluje toksično, aktivirajući različite patofiziološke mehanizme. Najviše literaturnih podataka, za sada, postoji o: oksidantnim i antioksidantnim mehanizmima i indukovanoj apoptozi (207), hroničnoj inflamaciji (208) i imunosupresiji (209), procesima interferencije sa enzimima, proteinima i metabolizmom (210) i indukovanoj genotoksičnosti (211). Danas veoma atraktivan i relevantan mehanizam koji se i nalazi u fokusu brojnih istraživanja, predstavlja izmena homeostaze unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} kao indeks toksičnih oštećenja povezanih sa hroničnom izloženosti aluminijumu (212). Neosporno je da se korišćenjem brojnih eksperimentalnih studija, na osnovu čega je formiran i naš eksperimentalni model, nametnula ideja da hronična izloženost aluminijumu narušava puteve homeostaze posredovane Ca^{2+} .

Pošto Al^{3+} i Ca^{2+} dele isti atomski radijus, osnovana je pretpostavka da aluminijum stupa u interakciju sa mestima za vezivanje kalcijuma, narušavajući njegovu homeostazu. Štaviše, kalcijum je definisan kao najraznovrsniji unutarćelijski glasnik koji kontroliše upravljanje mnogim ćelijskim funkcijama. U miljeu poremećene homeostaze Ca^{2+} mitohondrije povećavaju proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta, sa razvojem oksidativnih oštećenja i indukovanom autofagijom i apoptozom. Slično tome, funkcija enzima kalcijum-

ATPaze takođe može biti poremećena, što dovodi do remećenja funkcije ćelijskih organela (213). Neki autori sugerišu da aluminijum preko inhibicije citohrom oksidaze ometa metabolizam unutar mitohondrija, što ima za posledicu povećanje aerobnog metabolizma, iscrpljenje proizvodnje ATP-a i konačno omogućavanje akumulacije Ca^{2+} u ćelijama (214). Sve ukazuje na verovatnu patofiziološku vezu između poremećaja Ca^{2+} i oksidativnog oštećenja. Istovremeno, voltažno zavisni Ca^{2+} kanali se aktiviraju promenom membranskog potencijala. Ovi kanali su identifikovani kao kao L-tip, P/K-tip, R-tip, N-tip i T-tip, dok verapamil pretežno blokira L i T tipove kanala, sa većim afinitetom za depolarizovane kanale (215).

Smatra se da je anemija prva manifestacija toksičnog delovanja aluminijuma, pošto su mnoga istraživanja dokazala prisustvo mikrocitne anemije u odsustvu nedostatka gvožđa u slučajevima hronične izloženosti aluminijumu (216). Rezultati naše studije u korelaciji su sa nalazima ostalih istraživača, pošto su nakon hronične izloženosti AlCl_3 (tokom perioda od osam nedelja, nezavisno od aplikovane doze), svi eksperimentalni pacovi razvili mikrocitno hipohromnu anemiju. Od potencijalnog kliničkog značaja predstavlja nalaz značajnog poboljšanja evaluiranih hematoloških parametara (RBC, Hg, Hct, MCV, MCHC) u slučajevima premedikacije verapamilom, kod svih primenjenih doza aluminijuma. Iz navedenog se može zaključiti da verapamil značajno ublažava hematološku toksičnost izazvanu aluminijumom. Porast koncentracije hepcidina od ~ 2,6 puta (za obe doze AlCl_3) sugeriše da opterećenje aluminijumom, najverovatnije, indirektno smanjuje mogućnost ulaska gvožđa u njegove ciljne ćelije, odnosno prekursore eritrocita. Treba naglasiti da hepcidin predstavlja negativan i najvažniji regulator metabolizma gvožđa. Istraživači su dokazali da su koncentracije hepcidina značajno povišene u stanjima prekomerne produkcije proinflamatornih citokina ($\text{IL-1-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 , $\text{INF-}\gamma$). To dovodi do sekvestracije gvožđa u tkivima u kojima se ono inače deponuje, restrikcije gvožđa potrebnog za eritropoezu, hipoferemije i slabe zasićenosti transferina, koji je bio značajno smanjenih koncentracija u ovoj studiji. Povišeni nivoi hepcidina mogu da aktiviraju eritrofagocitozu, posebno u slučajevima akutne intoksikacije (217). Relevantna je hipoteza da ovi patogenetski mehanizmi mogu, makar delimično, da budu odgovorni za patogenezu mikrocitne anemije u slučajevima hronične akumulacije aluminijuma.

Anemija povezana sa hepcidinom uglavnom je definisana kao umerena normohromno-normocitna anemija, pri čemu se analizom hematoloških parametara ove studije zaključuje o značajnom smanjenju vrednosti MCV i MCHC. Ovakav rezultat implicira postojanje dodatnog, odnosno sekundarnog patofiziološkog mehanizma, kojim bi se objasnile ovakve hematološke promene (značajna mikrocitoza i hipohromija). Rezultat o vrlo niskoj zasićenosti transferina gvožđem (tokom čitavog eksperimenta) najverovatnije nastaje kao posledica povećane

proizvodnje hepcidina, a to ukazuje na verovatnoću formiranja kompleksa aluminijuma i transferina koji eritroidnim prekursorima isporučuje aluminijum, umesto gvožđa. Relevantna je pretpostavka da se na porast koncentracije hepcidina, koji interferira sa metabolizmom gvožđa, preko terapeutske interferencije sa hepcidinom može delovati i poboljšati koncentracija gvožđa i njegovih proteina u plazmi. Indikativan rezultat ove studije o značajnom popravljaju vrednosti MCV i MCHC nakon primene verapamila može se objasniti hipotezom da AlCl_3 menja propustljivost membrane eritrocita za jone i zaustavlja (ili makar smanjuje) funkciju katjonske pumpe (218). Ovo istraživanje donekle verifikuje tezu da AlCl_3 narušava funkciju eritrocitne membrane tako što menja aktivnost Ca^{2+} -ATPaze i da je ovaj fenomen moguće ublažiti blokadom kalcijumskih kanala.

Što se tiče tkiva jetre, pokazana je povećana aktivnost enzima u plazmi (parametara nekroze hepatocita), kao i akumulacija aluminijuma u tkivu kod svih eksperimentalnih životinja. Premedikacija verapamilom dovela je do statistički značajnog smanjenja akumulacije aluminijuma u jetri, ali ne i do smanjenja biohemijskih markera nekroze jetre (AST i ALT). Rezultati ove studije idu u prilog tvrdnji da aluminijum deluje toksično i izaziva nekrozu tkiva jetre i posledične biohemijske abnormalnosti (219). Pretpostavlja se da sposobnost aluminijuma da se veže za fosfoprotein koji je povezan sa mikrotubulima i smešten u citoskeletu, koji je sastavni deo plazmatskih membrana ćelija jetre, na kraju rezultira nekrozom ćelija jetre. Patogeneza nekroze hepatocita može se objasniti ne samo remećenjem glikolize, poremećajima stvaranja ATP-a, Krebsovog ciklusa i oksidacije lipida i proteina, već i unutarćelijskim taloženjem kalcijuma kao dodatnim mehanizmom. Zanimljivo je da je blokada Ca^{2+} kanala verapamilom nesporno umanjila akumulaciju aluminijuma u jetri ($p < 0,001$), bez obzira na primenjenu dozu AlCl_3 , ali nije značajno uticala na koncentraciju enzima nekroze jetre. Da bi se definisan tačan protektivni mehanizam potrebna su dodatna istraživanja na većem broju eksperimentalnih uzoraka.

Dokazano je da intoksikacija aluminijumom značajno utiče na reproduktivni sistem eksperimentalnih životinja i da ima za posledicu smanjenje plodnosti. Prekomerna izloženost pacova aluminijumu dovodi do lezija testisa, poremećajem hormonske ravnoteže i poremećajem prenatalnog razvoja prostate (220). U prilog ovome govore literaturni podaci, da osobe koje imaju oligospermiju imaju povećane koncentracije aluminijuma u poređenju sa zdravim pojedincima. Dokumentovano je da su ključni faktori koji dovode do neplodnosti smanjena proizvodnja i broj spermatozoida, smanjena pokretljivost i proizvodnja aberantne sperme (221). Pored toga što je utvrđena povećana koncentracija aluminijuma u tkivu ($p < 0,001$), bez obzira na veličinu aplikovane doze AlCl_3 , još je važnije da se ovaj efekat može ublažiti

primenom verapamila. Suprotno ovim nalazima, neki autori nisu dokazali akumulaciju aluminijuma u testisima, ali su dokumentovali smanjenu funkciju testisa, koja se manifestovala aberantnom spermatogenezom i pojavom malformacije spermatozoida (214). Većina istraživača se slaže da izlaganje aluminijumu najverovatnije uzrokuje metaboličku inhibiciju delovanjem na kiselu fosfatazu, sukcinat dehidrogenazu i laktat dehidrogenazu, uključujući njihove izoenzime. U novije vreme zabeleženo je da aluminijum pretežno inhibiše aktivnost Ca^{2+} -ATPaze, što ima za rezultat disfunkciju aktivnosti membrane testisa (214). Ovi literaturni podaci daju relevantno objašnjenje za predstavljene rezultate, što dodatno potvrđuje zaštitno dejstvo verapamila.

Dokazano je da aluminijum doprinosi patogenezi inflamatorne reakcije regulacijom ekspresije proinflamatornih citokina, IL-1 β , TNF- α i IL-6 i C-reaktivnog proteina (221) čime se hepatocitima daje signal za sintezu hepcidina. Prema dizajnu studije, iz krvi eksperimentalnih životinja nije merena koncentracija citokina, dok je postojanje inflamacije dokazano porastom koncentracija C-reaktivnog proteina i feritina, a indirektno i merenjem koncentracije hepcidina u plazmi. Na osnovu činjenice da nijedan od biomarkera inflamacije nije značajno smanjen nakon upotrebe verapamila, može se pretpostaviti da porast njihovih koncentracija jeste posledica promene koncentracija kalcijuma generisanog iz unutarćelijskog depoa, fenomena koji se javlja u prisustvu metala, ali se ne može značajno ublažiti davanjem verapamila.

6.2. Patofiziološki mehanizmi mikrocitoze indukovane toksičnim efekom aluminijuma

Integritet ćelija se održava zahvaljujući postojanju ćelijske membrane. Danas se sa velikom sigurnošću zna da hronična izloženost aluminijumu, različitim patogenetskim procesima, ometa održivost ćelijske membrane, što dovodi do vitalne ugroženosti ćelija. Jedan od tipičnih primera delovanja aluminijuma predstavlja eksperimentalni model Alchajmerove bolesti, gde se nakon intoksikacije aluminijumom verifikuje porast "fluidnosti" membrane trombocita, a smanjenje na nivou eritrocita (222,223). Pored ovoga, dokazano je da izloženost aluminijumu u *in vitro* i *in vivo* uslovima značajno menja osmotsku propustljivost eritrocita, dovodeći istovremeno do skraćenja životnog veka crvenih krvnih zrnaca (224). Nakon toga je dokazano da promena osmotske rezistencije (porast ili smanjenje) zavisi od nekoliko varijabli, od kojih su najznačajnije vrsta i načini aluminijumskog delovanja (225-228). Takođe je dokazano da eritrociti životinja hronično tretiranih aluminijumom značajno podležu procesima apoptoze eritrocita (eriptoze) (229), čime se dodatno menja njihova osmotska rezistencija (224). Pomenutim mehanizmima aluminijum remeti membranu eritrocita, dovodeći do njene

destabilizacije i remećenja funkcije struktura koje regulišu transmembranski transport jona. Posledično, ATP-aza u sklopu ćelijske membrane može da izgubi određeni nivo funkcije, tokom aluminijumske intoksikacije. Dokazano je da aluminijum u određenoj koncentraciji i tokom produženog delovanja inhibira aktivnost pumpi: Na^+K^+ -ATP-aze, Mg^{2+} -ATP-aze i Ca^{2+} -ATP-aze na nivou eritrocita, vaskularnih endotelnih ćelija, testisa i jajnika (227,230,231) pacova. Promena veličine eritrocita (anizocitoza) izazvana aluminijumom može takođe biti praćena i dodatnim promenom oblika eritrocita, odnosno nalazom poikilocitoze i pojavom ehinocita, akantocita i stomatocita u perifernom razmazu krvi tretiranih životinja, zbog aluminijumom indukovane promene membranemorfologije (232-234). Nakon dugotrajnog oralnog unosa aluminijuma, šistociti i "target" eritrociti takođe predstavljaju očekivani nalaz u perifernoj krvi pacova (232,233), pri čemu se pored eritrocita, i na novou limfocita mogu naći značajne promene lipidnog dvosloja ćelijske i mitohondrijske membrane (235). Proteinske komponente eritrocitnih membrana, kod najvećeg broja tretiranih životinja, podležu procesu degradacije, pri čemu je najznačajniji gubitak detektovan u slučaju proteina 3 na nivou eritrocitne membrane, zatim inhibicija enzima vezanih za membranu, inhibicija proteina kalbindina u enterocitnoj membrani i smanjena ekspresija proteina GLUT4 u membrani skeletnih mišića (222,223,226). Istovremeno je dokazano da bi tokom apoptoze eritrocita izazvane aluminijumom, njihova površina mogla dodatno da bude izložena sledećim procesima: eksternalizaciji fosfatidilserina (236), inhibiciji ekspresije proteina membranskih receptora u gonadama (218,220,230,231), disregulaciji funkcija receptora eritropoetina na eritroidnim progenitorima (222,223) i gubitku membranskih površinskih ostataka sijalinske kiseline na vaskularnom endotelnom tkivu sa oštećenim međućelijskim vezama.

Na osnovu ovakvih rezultata očekivano je da je izloženost aluminijumu povezana sa značajnim smanjenjem razvoja kolonija eritroidnih (CFU-E) prekursora na nivou koštane srži, u slučajevima hronične intoksikacije aluminijumom. Toksični efekat aluminijuma na eritroidne progenitorne ćelije i zrele eritrocite značajno i inverzno koreliše sa brzinom rasta i diferencijacijom eritrocitne loze i pozitivno koreliše sa povećanom razgradnjom eritrocitnog proteina 3 (222,223), a dokazan je i mitodepresivni efekat na nivou koštane srži miševa čiji su preci tretirani aluminijum hloridom (214). Rezultati ranijih istraživanja ukazuju da anemija koja se razvija nakon hronične izloženosti aluminijumu nije značajno povezana sa smanjenjem regenerativne aktivnosti koštane srži ili sa retukolozitom (237), ali sa danas sa sigurnošću zna da je inhibicija proliferacije koštane srži inicijalni događaj u razvoju mikrocitne anemije. Dokazano je da je anemija multifaktorskog karaktera i da favorizujući uzroci anemije podrazumevaju: proizvodnju aberantnog hemoglobina zbog inhibicije enzima

za sintezu hema, izmenjenu strukturu i povećanu propustljivost membrane eritrocita, skraćivanje životnog veka crvenih krvnih zrnaca usled apoptoze, promenu osmotske rezistencije i neadekvatnu utilizaciju gvožđa (222-230).

Prema svojim patofiziološkim karakteristikama anemija nastala usled intoksikacije aluminijumom jeste mikrocitno-hipohromna i klinički je relevantno da se kod hronične izloženosti, hematološki parametri vremenom mogu korigovati, odnosno poboljšati, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Prospektivnim praćenjem životinja dokazano je permanentno održavanje mikrocitoze i hipohromije (238). Rezultati drugih studija ukazuju da akumulacija aluminijuma dovodi do remećenja homeostaze hema, pri čemu je dokazana smanjena aktivnost dehidrataze aminolevulinske kiseline i povećana aktivnost hem-oksigenaze u jetri pacova. Ovako izmenjena enzimaska aktivnost u vezi je sa aktivacijom JNK puta, što je patogenetski mehanizam indikativan za značajnu razgradnju hema (239). Postoje i dokazi o nepostojanju promena u hemoglobinu, hematokritu i osmotskoj rezistenciji eritrocita u brojnim eksperimentalnim ekspozicijama aluminijumu, pri čemu su ovakve studije najčešće dizajnirane tako da su životinje bilo veoma kratko izložene delovanju aluminijuma u nedovoljno toksičnim dozama, te naše rezultate nismo diskutovali u kontekstu ovako dizajniranih istraživanja. Zaključno, najveći broj istraživanja, uključujući i našu studiju, upućuje da je hematološki efekat aluminijumske toksikoze nastanak mikrocitne anemije, uz smanjenje broja eritrocita i svih ispitivanih hematoloških parametara, koji se značajno mogu korigovati premedikacijom verapamilom.

6.3. Morfometrijske i imunohemijske promene testisa tretiranih životinja pre i nakon administracije verapamila

Rezultati naše studije ukazuju da se aluminijum značajno taloži u testisima nakon hronične administracije, da dovodi do evidentne apoptoze, uz istovremeno smanjenje antiapoptotskog potencijala, kao i da se navedeni efekti mogu ublažiti premedikacijom verapamilom. Testis je organ čije je esencijalna funkcija stvaranje sperme i sinteza hormona, uključujući testosteron, tako da je održiva hipoteza da narušavanjem njegove morfologije, što je dokazano na našem modelu, neminovno dolazi do redukcije ovih funkcija, a samim tim i do disfunkcije muškog reproduktivnog zdravlja.

Testisi se sastoje iz brojnih seminifernih tubula i intersticijskog tkiva, obloženih tunikom albugineom. Seminiferni tubuli predstavljaju strukture u kojima se tokom procesa spermatogeneze, formiraju zreli spermatozoidi, odnosno preko maturacije germinativnih

ćelija dolazi do formiranja haploidnih spermatozoa. Na rođenju, seminiferi tubuli sadrže spermatogonijske stem ćelije, da bi se tokom prve faze spermatogeneze Sertolijeve ćelije spojile, sa ciljem formiranja kompartmana u okviru seminiferog epitela (bazalni i luminalni deo). Spermatogonije koje se nalaze u bazalnom delu dele se na spermatogonije tip A, koje će zameniti prekursorne ćelije i spermatogonije tip B, koje, tokom mejoze u luminalnom delu, postaju primarne spermatocite. Nakon primarne deobe, formiraju se sekundarne spermatocite, od kojih potom mejotičkom deobom nastaju spermatide. Tokom kasne spermatogeneze od spermatida nastaju spermatozoe. Na našem uzorku mikroskopski su sagledane sve razvojne forme spermatozoida nakon aluminijumske intoksikacije. Grupe pacova koje su tretirane $AlCl_3$ pokazivale su značajne morfološke promene u spermatogenezi (redukcija spermatogeneze, zastoje u sazrevanju na nivou spermatida, sa odsutnim, retkim ili fragmentisanim spermatozoidima), dok su grupe životinja koje tretirane verapamilom i $AlCl_3$ imale manje izražene promene, uz poboljšanje spermatogeneze. Važno je naglasiti da je permanentno prisutna redukcija spermatogeneze, vakuolarna degeneracija, dezorganizacija polnih ćelija, kao i intersticijski edem, bez obzira na aplicirani verapamil.

Procena efekata aluminijumske toksičnosti na reproduktivni sistem bazirana je na osnovu rezultata dobijenih na eksperimentalnim modelima, s obzirom na nedostatak prospektivnih studija u humanoj populaciji. U zavisnosti od dizajna studije i formulisanih ciljeva istraživanja, posledice hronične ekspozicije aluminijumu na reproduktivno zdravlje mogu biti verifikovane na različite načine, pri čemu su svi dobijeni rezultati kategorisani u zavisnosti od toga da li ukazuju na sveukupnu (kumulativnu) aluminijumsku toksičnost, ali i na dnevnu i/ili akutnu ekspoziciju aluminijumu (240). Komplikantnost studija procenjuje se i na osnovu toga da li su u studiju paralelno uključene eksperimentalne životinje oba pola, tretiranih na osnovu aktuelnih preporuka za aplikaciju aluminijuma (240). Rezultati nekoliko studija ukazuju da niske doze aluminijuma ($<20 \mu\text{g/kg/dan}$) ne dovode do statistički značajnog toksičnog efekta aluminijuma na reproduktivni system, ali je istovremeno dokazan statistički značajan toksični efekat nakon aplikacije visokih doza ($>50 \mu\text{g/kg/dan}$ i $> 500 (>50 \mu\text{g/kg/dan})$) (241,242). Drugi istraživači su evidentirali da doze niže od $60 \mu\text{g/kg/dan}$, pri totalnoj ekspoziciji $>50 \mu\text{g/kg}$, ne dovode do statistički značajne sistemske toksičnosti, ali je dodatno dokazano da postoje značajni sporedni efekti u slučajevima aplikovanih doza viših od $20 \mu\text{g/kg/dan}$, totalna ekspozicija $> 600 \mu\text{g/kg}$ (243,244). Najznačajni zaključak svih eksperimentalnih studija nedvosmisleno ukazuje na to da je muški pol životinja prijemčiviji za razvoj reproduktivne toksičnosti izazvane aluminijumom (240). Najveći broj studija koje su dokazale da je hronična ekspozicija visokim dozama aluminijuma, kao i studije koje su

dokazale da se aluminijumska toksičnost ispoljava i nakon aplikacije niskih doza ($2/3 \leq 20$ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$), ukazuju na to da aluminijum dovodi do smanjenja reproduktivne funkcije kod muških životinja, pri čemu bi ovakva ekspozicija odgovarala ekspoziciji humane populacije aluminijumu, ali u značajno nižoj dozi ($0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Procena reproduktivnog zdravlja eksperimentalnih životinja vrši se na osnovu nekoliko parametara: težina testisa, broj spermatozoida, procenat abnormalne sperme, motilitet i vijabilnost spermatozoida, određivanjem sadržaja MDA, SOD i CAT u testisima, koncentracije testosterona u krvi/serumu/plazmi (240). Rezultati naše studije bazirani su na osnovu histopatološkog bojenja tkiva testisa, imunohemijske analize (procena ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih markera) i određivanjem koncentracije aluminijuma u tkivu. Studije su dokazale da su broj spermatozoida i koncentracija SOD, nakon dnevne i ukupne ekspozicije aluminijumu distribuirani normalno i da statistički značajno i negativno korelišu, ali samo u slučajevima ukupne aluminijumske toksičnosti ($p < 0,0076$ i $p < 0,0235$). Na osnovu dizajna studije nismo analizirali semenu tečnost tretiranih životinja, što se može smatrati značajnim limitirajućim faktorom istraživanja, s obzirom da su literaturni podaci o spermi tretiranih životinja veoma ilustrativni. Za stepen abnormalnosti spermatozoida, kao analiziranu varijablu, takođe je dokazano da pozitivno i značajno korelišu sa dnevnim i totalnim unosom aluminijuma. Vrednosti MDA, kod svih eksperimentalnih životinja više su, a koncentracije testosterona konstantno niže u poređenju sa životinjama koje nisu bile izložene aluminijumu, ali nije dokazana značajna korelacija sa količinom unetog aluminijuma (240). Jedna studija je dokazala da ukoliko su muški pacovi subhronično izloženi AlCl_3 dolazi do značajne akumulacije aluminijuma u testisima, što je u pozitivnoj korelaciji sa našim rezultatima, pri čemu se posledice poremećaja funkcije testisa ogledaju u poremećenoj spermatogenezi i porastu stope malformacije sperme (245). Nakon tretiranja dozom aluminijuma koja je analogna dozi kojoj je izložena humana populacija tokom 60 dana, testisi pacova akumulirali su relativno niske nivoe aluminijuma, od $3,35 \mu\text{g}/\text{g}$, ali je ova količina bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa povećanim oksidativnim stresom i stepenom inflamacije, smanjenom dnevnom proizvodnjom sperme, smanjenjem broja i pokretljivosti spermatozoida i povećanjem abnormalnosti spermatozoida (246). Pomenute studije ukazuju da su broj spermatozoida, količina SOD u spermi i procenat abnormalne sperme najbolji indikatori reproduktivne disfunkcije kod muškog pola. Istovremeno se zaključuje da je reproduktivna funkcija značajno više pogođena u slučajevima hronične ekpozicije nego kada je u pitanju dnevna, akutna ili krotkoročna izloženost. Takođe je dokazano da prolongirana ekspozicija aluminijumu eksperimentalnih miševa i pacova u trajanju od 35, 50 i 64 dana, dovodi do

inhibicije čitavog procesa spermatogeneze, a ista grupa autora predložila je da se ovaj zaključak može primeniti i na humanu populaciju.

Studije vezane za reproduktivno zdravlje nakon hroničnog trovanja aluminijumom u ljudskoj populaciji veoma su retke. U spermatozoidima osoba koje su profesionalno izložene nalazi se aluminijum, a pacijenti sa oligospermijom dokazano imaju veću koncentraciju aluminijuma od zdravih osoba (247). Mali broj sprovedenih studija ukazuje da je vijabilnost spermatozoida kod ispitanika značajno smanjena u slučajevima kada je koncentracija aluminijuma u rasponu od od 18 do 101 $\mu\text{g/l}$ (248). Na osnovu rezultata skorašnjih istraživanja dokazano je da su koncentracije aluminijuma u spermi znatno više, pri čemu je dokazano da je kod radnika u fabrikama prosečna količina aluminijuma u semenoj tečnosti iznosi oko 540 $\mu\text{g/kg}$ (249), u poređenju sa kontrolnom grupom, gde je koncentracija aluminijuma oko 299 $\mu\text{g/kg}$ (250). Evidentirano je da ukoliko je semena tečnost tretirana dozom od 0,125-30 mM AlCl_3 dolazi do smanjenja motiliteta spermatozoida (zavisno od koncentracije administriranog aluminijuma), a istovremeno i do porasta koncentracije MDA.

Pored evidentnih morfoloških promena testisa, dokazane su i značajne promene funkcije, u smislu smanjenja lučenja pojedinih hormona: predominantno smanjenja koncentracije testosterona i luteinizirajućeg hormona (LH) u serumu i smanjenja ekspresije proteina androgenih receptora, pri čemu nije dokazana statistički značajna promena u sintezi i sekreciji FSH (230,251). Kod potomaka pacova koji su tretirani aluminijumom, u studiji koja je obuhvatila tri generacije (F0, F1, F2) eksperimentalnih životinja, evidentirana su smanjeni nivoi testosterona i LH, smanjena težina testisa i porast proizvodnje abnormalnih nepokretnih spermatozoida, dok za roditeljsku grupu (F0) nisu dokazane takve reproduktivne abnormalnosti (252). Pacovima kojima je, preko bočne komore u cerebrospinalnu tečnost, ubrizgan AlCl_3 (4,125 pmola) detektovano je značajno smanjenje nivoa FSH, LH i testosterona u serumu i smanjenje broja spermatozoida iz vas deferensa i epididimida (253). Druge vrste eksperimentalnih životinja koje su tokom eksperimenta bile izložene aluminijumu, proizvodile su manje spermatozoida lošijeg kvaliteta u poređenju sa kontrolnom grupom. Pomenuta studija je dokazala da je muški fertilitet znatno vulnerabilniji u poređenju sa ženskim, jer kod ženki nije dokazana statistički značajna redukcija reproduktivnog kapaciteta (254). Naredna studija koja se bavila ispitivanjem funkcije testisa dokazala je da nakon intraperitoneumskog tretmana od 50 mg/kg aluminijuma u trajanju od 20 dana, nivo testosterona u krvi i LH u muškoj eksperimentalnoj grupi bili su statistički značajno viši, pri čemu ista promena nije zabeležena merenjem koncentracije FSH (255). Takođe je dokazano (256) da je primena AlCl_3 (20 mg/kg) mužjacima pacova gavažom, tokom 70 dana, dovela do redukcije fertiliteta i

disfunkcije testisa. Brojne studije su dodatno dokazale da hronično delovanje aluminijuma dovodi do smanjenja broja spermatozoida, njihove pokretljivosti i održivosti, sa porastom broja mrtvih i abnormalnih spermatozoida (214). Težina testisa i epididimusa i nivo testosterona i luteinizirajućeg hormona u serumu smanjeni su nakon izlaganja aluminijumu (256,257). Studija u kojoj su aluminijumom istovremeno tretirani i muški i ženski gerbili, dokazala je da kod novorođenčadi tretiranih životinja dolazi do značajnog poremećaja u razvoju prostate. Verifikovano je i da odrasle jedinke imaju povišene nivoe testosterona u serumu, sa niskom učestalošću androgenih receptora povezanih sa povećanom proliferacijom ćelija prostate (218). Na osnovu ove i sličnih studija sprovedenih na humanom (naročito kod radnika u rafinerijama) i animalnom uzorku, nedvosmisleno se zaključuje da izloženost aluminijumu dovodi do smanjenja reproduktivne funkcije kod muškaraca (240).

Iako su ove studije koristile različite metodološke pristupe, posebno u pogledu starosne dobi, kao i doze i vremena delovanja aluminijumske toksičnosti, zajednički je zaključak da aluminijum deluje kao toksični ksenobiotik, koji svojim sistemskim delovanjem i različitim patofiliološkim mehanizmima remeti i endokrine sisteme, menjajući ili serološke hormonske nivoe ili ekspresiju hormonskih receptora na nivou polnih žlezda.

Analogno pomenutim studijama, rezultati dobijeni na našem uzorku takođe ukazuju na toksičan uticaj aluminijuma na reproduktivni sistem, ali i protektivan efekat blokade kalcijumovih kanala. Dokazano je da je u eksperimentalnim grupama, u slučajevima pretretmana verapamilom, smanjeno taloženje aluminijuma i smanjen stepen apoptoze, što će biti diskutovano u finalnom poglavlju.

6.4. Patogenetski mehanizmi oštećenja testisa indukovanim toksičnim efekom aluminijuma

Osnovna pretpostavka aluminijumske genotoksičnosti bazirana je na rezultatima koji ukazuju na statistički značajan porast oksidativnog stresa u testisima nakon hronične izloženosti. Povišena koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta u testisima dovodi do oksidativnog oštećenja DNK, sa potencijalnim uticajem na reproduktivnu funkciju (258). Iz tih razloga, akumulacija aluminijuma dovodi do disfunkcije spermatogeneze, što se zaključuje i na osnovu našeg uzorka, a samim tim i do redukcije spermatozoida i visokog stepena malformacije sperme. Analogno tome, verifikovana je inhibicija metabolizma ma nivou testis, merenjem aktivnosti kisele fosfataze, sukcinat dehidrogenaze i laktat dehidrogenaze, kao i njihovih izoenzima (259). Takođe je evidentirana disfunkcija membrana testisa usled

inhibicije aktivnosti njene ATP-aze kod intoksikovanih životinja (220,230). Težine testisa i epididimida dokazano se smanjuju tokom izloženosti aluminijumu, uz konstantno smanjenje koncentracije testosterona (257).

Patofiziološko objašnjenje moglo bi da se bazira na tome da smanjena aktivnost LDH najverovatnije dovodi do energetskog deficita u spermatozoidima, dovodeći do njihove degeneracije. Pored pada aktivnost LDH, pretpostavlja se da dolazi do smanjenja aktivnosti i SDH, što bi bili patogenetski mehanizmi koji sinergistički dovode do redukcije potrebne energije za održanje spermatogeneze. Dokazano je (259) da su aktivnosti testisnih enzima alkalna fosfataza, (AP), SDH, LDH i LDH-x smanjene kod svih životinja izloženih aluminijum hloridu. ACP je enzim prisutan u lizozomima Lejdigovih ćelija, SDH i LDH u Sertolijevim i spermatozoidnim ćelijama, dok je LDHx specifičan enzim koji se stvara tokom faze primarnog formiranja spermatozoidnih ćelija. Polazeći od saznanja da su ovo rasporostranjeni i značajni enzimi unutar svih testisnih struktura, smanjenje i/ili izmena njihove aktivnosti svakako remeti sveukupnu funkciju testisa.

Pored biohemijskih abnormalnosti, izmena histološke strukture testisa takođe je izazvana akumulacijom aluminijuma (260), što je u skladu sa našim rezultatima. Druga studija je dodatno dokumentovala da smanjenje aktivnosti svih pomenutih enzima testisa (AP, SDH, LDH i LDH-x) prati histološke promene tkiva testisa, evidentirajući postojanje značajne i pozitivne korelacije između biohemijskih i histoloških abnormalnosti. Ista studija je dokazala da je kod eksperimentalnih životinja, nakon intraperitoneumske aplikacije $AlCl_3$, došlo do atrofije mitohondrija (260), što se i posredno može zaključiti, jer SDH predstavlja marker funkcije mitohondrija u testisima. Istovremeno, dokazano je da se LDH delimično nalazi i u matriksu mitohondrija unutar spermatozoida, tako da i smanjenje njegove aktivnosti takođe ukazuje na insuficijenciju funkcije mitohondrija i povišen oksidativni stres. Ukoliko bi se ovi eksperimentalni podaci analizirali u kontekstu humane populacije, oksidativni stres bi doveo do oksidativnog oštećenja DNK spermatozoida i stvaranja niskog nivoa antioksidativne zaštite, a samim tim i do redukcije reproduktivne sposobnosti. Analogno tome, ista grupa autora dokazala je da kod tretiranih životinja postoji niska koncentracija testosterona, koja je inverzno i značajno korelisala sa stepenom oksidativnog oštećenja, uz pretpostavku da je tako niska koncentracija testosterona indukovala i smanjenu aktivnost alkalne fosfataze. Osnovni zaključak pomenutih studija jeste da hronična izloženost aluminijumu dovodi do energetskog disbalansa unutar ćelija testisa, što dovodi do izmenjenog metabolizma oligoelemenata neophodnih za normalnu funkciju testisa i održanje spermatogeneze. Na osnovu rezultata našeg

istraživanja može se posredno zaključiti da se ovi efekti mogu ublažiti blokadom kalcijumovih kanala, odnosno administracijom verapamila.

6.5. Patogenetski mehanizmi apoptoze izazvane aluminijum hloridom

Pored redukcije energetskeg metabolizma kao značajnog patofiziološkog modaliteta aluminijumke toksičnosti, najnovija istraživanja ukazuju da akumulacija aluminijuma istovremeno dovodi i do akumulacije gvožđa. Agregati gvožđa nedvosmisleno dovode do značajnih oksidativnih oštećenja većeg broja ćelija, uključujući testise, mehanizmima lipidne peroksidacije, verifikovanih lezija DNK i visokim stepenom apoptoze. Dokazano je da je apoptoza eritrocita (eriptoza), limfocita i osteoblasta indukovana aluminijumskim jonima (261-264), a na osnovu naših rezultata može se govoriti i o visokom stepenu apoptoze na nivou tkiva testisa i jetre.

Apoptoza predstavlja vid programirane ćelijske smrti, pri čemu se u svakoj ćeliji programiranoj za umiranje dešava niz sukcesivnih promena koje dovode do degradacije jedarne DNK i jedarnih i citoplazmatskih proteina. Centar apoptotskog procesa predstavljaju mitohondrije, što je opisano kao mitohondrijski put apoptoze ili unutrašnji put. Mitohondrijski odgovor na stimulus za apoptozu usled izloženosti aluminijumskim jonima, regulisan je aktivacijom grupe "senzora", koji su članovi porodice Bcl₂ u koje spadaju antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-W) i proapoptotski članovi (Bax, Bak i Bid, Bim, Bad i drugi). Oni kontrolišu oslobađanje proapoptotskih proteina (citohrom C) iz mitohondrija u citoplazmu regulacijom propustljivosti mitohondrijskih pora (265). Pored toga, međusoban odnos antiapoptotskih i proapoptotskih članova porodice Bcl-2 finalno određuje da li će ćelija ući u proces apoptoze, pri čemu je njena kontrola striktno pod uticajem proteina Bcl-2 porodice. Još uvek ne postoji dovoljno literaturnih podataka koji ukazuju kakav je (i u kojoj meri) uticaj AlCl₃ na strukturu i funkciju mitohondrija, kao i na članove Bcl-2 familje, čemu bi rezultati ove studije mogli značajno da doprinesu.

Na osnovu imunohistohemijske analize apoptotskih markera eksprimiranih na tkivu testisa nakon administracije aluminijum hlorida, dokazano je da postoji značajna ekspresija proteina Bax i Bid (proapoptotski markeri) na nivou premejskih ćelija u grupama tretiranih životinja, što implicira aktiviranu apoptozu kod životinja eksperimentalne grupe i u skladu je sa aktuelnim literaturnim podacima. Slične promene su, pored premejskih ćelija, verifikovane i na nivou Lejdigovih ćelija, dok je antiapoptotski protein, Bcl-2, bio eksprimiran na nivou Lejdigovih ćelija u svim ispitivanim grupama, nezavisno od aplikovane dokze aluminijum

hlorida. Istovremeno je verifikovan protektivni efekat premedikacije verapamilom, jer je ekspresija proapoptotskih proteina (Bax i Bid) bila redukovana u grupama sa farmakološkom blokadom kalcijumovih kanala. Sve verifikovane promene bile su dozno zavisne.

Pretpostavka je da je apoptoza indukovana mehanizmima kao što su narušena homeostaza kalcijuma, poremećeni signalni putevi $Ca^{2+}/CaMKII$ i JNK i aktivacija spoljašnjeg puta apoptoze, pri čemu pored posrednog delovanja, aluminijum verovatno i svojim direktnim toksičnim efektom remeti funkciju mitohondrija (265). Dokazano je da izloženost aluminijumu dovodi do "upregulacije" mitohondrijske signalizacije, do oslobađanja citohroma C iz mitohondrija u citoplazmu i do aktivacije određenih tipova kaspaza (3 i 9). Pored toga, signalni putevi posredovani preko Fas-a takođe su aktivirani u slučajevima intoksikacije aluminijumom, što dovodi do većeg mitohondrijskog oštećenja, odnosno do aktivacije apoptoze hidrolizom Bid-a. Istovremeno, ekspozicija visokim dozama $AlCl_3$ dovodi do inhibicije ekspresije Bcl-2 i Bid, kao i do povećanja ekspresije Bax, Bak, Bim i tBid, što reguliše mitohondrijama posredovanu apoptozu, koja je dozno-zavisna (266). Naši rezultati o dozno-zavisnom delovanju aluminijuma mogu se tumačiti u skladu sa ovim pretpostavkama. Ovakav proapoptotski efekat dokazan je na različitim tkivima, pri čemu je u svim slučajevima dokumentovana smanjena vijabilnost ćelija, što je u skladu sa našim nalazom na nivou premejske ćelijske linije. Drugi istraživači su potvrdili da je ćelijska vijabilnost u inverznoj i značajnoj korelaciji sa stepenom apoptoze (267-270).

Trovanje metalima značajno menja funkciju mitohondrija, pri čemu indukuje apoptozu smanjenjem depolarizacije membranskog potencijala mitohondrijske membrane ($\Delta\Psi_m$), što se smatra prvim korakom u razvoju apoptoze, a samim tim i njenim biomarkerom. Studije su pokazale da $\Delta\Psi_m$ kolabira u početnim stadijumima apoptoze, što dovodi do razaranja spoljašnje membrane mitohondrija i omogućava oslobađanje citohroma C u citoplazmu, što je najverovatnije posledica delovanja aluminijum trihlorida. Disbalans ćelijske homeostaze kalcijuma dovodi do depolarizacije $\Delta\Psi_m$, a samim tim i do apoptoze tretiranih ćelija (271). Aluminijum trihlorid značajno remeti homeostazu kalcijuma i aktivira signalne puteve $Ca^{2+}/CaMKII$ oštećenih ćelija, što će kasnije biti detaljno diskutovano, pri čemu se disregulacija $\Delta\Psi_m$ najverovatnije dešava sinergističkim mehanizmima: patološkim taloženjem kalcijuma i direktnom aluminijumskom toksičnošću. Nakon izlaska mitohondrijskog citohroma C u citoplazmu, dolazi do cepanja i aktivacije prokaspaze 9 i formiranja apoptozoma, sa indukcijom kaskadne kaspazne reakcije i finalnom ireverzibilnom apoptozom, što je nekoliko studija i dokazalo (272-274). Zaključno, tretman aluminijum hloridom dovodi do aktivacije mitohondrijama posredovanih signalnih puteva uz istovremenu depolarizaciju mitohondrijskog

membranskog potencijala, oslobađanja citohroma C iz mitohondrija u citoplazmu, kao i do aktivacije kaspaza. Dokazano je da u slučajevima hronične izloženosti aluminijum hloridu takođe aktivirana signalizacija putem Fas-liganda i aktivacije drugih tipova kaspaza (8). Smatra se da administracija $AlCl_3$ dovodi do smanjene ekspresije Bcl-2 proteina, uz istovremeno značajan porast ekspresije izraz Bax, Bak i Bim, što su naši rezultati delimično i dokazali. Najveći broj istraživača slaže se da izloženost $AlCl_3$ izaziva apoptozu tretiranih ćelija kroz aktiviranje signalnih puteva posredovanih mitohondrijama i izmenjenu ekspresiju proteina Bcl-2, uz učešće Fas-a (264). Nedavne studije nedvosmisleno su dokazale da izmena ekspresije Bcl-2 proteina značajno utiče na aktivaciju ili supresiju apoptoze u slučajevima hronične izloženosti aluminijumu (275), pri čemu je, kao antiapoptotski molekul, Bcl-2, izuzetno značajan za preživljavanje tretiranih ćelija i očuvanost njihovih funkcija (275). Za razliku od Bcl-2, proapoptotski proteini: Bax, Bak i Bim imaju kauzalnu ulogu u razvoju apoptoze (276). Stimulacija ili inhibicija ekspresije Bcl-2, Bak, Bak i Bim od ključnog su značaja za preživljavanje, tačnije da li će unutar ćelija i/organskih sistema na koje je delovano aluminijumom doći do aktivacije apoptoze ili ne. Pretpostavka je da se aluminijumska toksičnost, makar delimično, ogleda u inhibiciji ekspresije proteina Bcl-2, dok je povećana značajna ekspresija Bax, Bak i Bim u različitom stepenu, što ukazuje da proteini porodice Bcl-2 učestvuju u patogenezi apoptoze izazvane delovanjem $AlCl_3$.

Mitohondrije predstavljaju “target” delovanja Bcl-2 proteina koji učestvuju u regulaciji apoptoze. Lezija mitohondrija i translokacija citohroma C značajno su naglašeni, tačnije pogoršani u slučajevima inaktivacije Bcl-2 ili aktivacije Bax, Bak i Bim proteina. Ovakav efekat jasno sugeriše da aktivacija apoptotskih puteva posredovanih mitohondrijama nastaje usled poremećaja ekspresije predominantno proteina Bcl-2. Pored toga, potencijalni “targeti” JNK, sa krajnjim efektom regulacije oslobađanja citohroma C, takođe su članovi porodice Bcl-2 (277). Dokazano je i da apoptoza aktivirana $AlCl_3$ istovremeno dovodi i do aktivacije signalnih puteva JNK posredovanih oksidativnim oštećenjem ćelija (reaktivnim kiseoničnim vrstama), što je praćeno povećanjem ekspresije mRNA za Bax i smanjenjem ekspresije mRNA za Bcl-2 (278). Aktivacija signalnog puta JNK potencijalno interferira sa mitohondrijama i na taj način omogućava aktivaciju apoptoze, tačnije dovodi do izmene ekspresije Bcl-2 i Bax u ćelijama izloženim aluminijumu. Na osnovu iznetih dokaza može se zaključiti da apoptoza ćelija usled hronične izloženosti aluminijumu, što je na našem modelu i dokazano, najverovatnije nastaje usled aktivacije mitohondrija, odnosno indukcije apoptoze, nastale izmenom regulacije proteina Bcl-2, Bax, Bak i Bim.

Mitochondrije su organele označene kao “životni centar ćelije” i ključni posrednik u patogenezi apoptoze (279), uključujući nekoliko patofizioloških mehanizama: poremećaj homeostaze kalcijuma, aktivaciju signalnih puteva $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}$ i JNK, spoljašnjeg apoptotskog puta i izmenjenu ekspresiju proteina porodice Bcl-2 (280). Ovi faktori direktno ili indirektno indukuju leziju mitohondrija, te se sa pravom smatra da su one primarna meta aluminijumske toksičnosti. Rezultati naše studije ukazuju da se apoptoza usled delovanja aluminijuma, kao i njegovo taloženje u tkivima, značajno smanjuju blokiranjem kalcijumovih kanala. Time je dokazano da je poremećaj homeostaze kalcijuma jedan od ključnih patofizioloških mehanizama aluminijumske toksičnosti da se delimično može ublažiti davanjem verapamila, a propektivni mehanizam blokade kalcijumovih kanala biće diskutovan u poslednjem poglavlju.

6.6. Promene tkiva jetre tretiranih životinja pre i nakon administracije verapamila i patofiziologija oštećenja hepatocita

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajno oštećenje tkiva jetre usled akumulacije aluminijuma u hepatocitima, što je verifikovano porastom aktivnosti enzima koji impliciraju nekrozu hepatocita. Dokazano je da su nakon administracije aluminijum hlorida statistički značajno povišene aktivnosti enzima AST, ALT, alkalne fosfataze (ALP), kreatin kinaze, γGT i LDH, pri čemu je ovaj porast bio dozno-zavistan u odnosu na dozu apliciranog aluminijuma. Istovremeno je dokazana i značajna dozno-zavisna akumulacija aluminijuma u tkivu jetre. Protektivan efekat premedikacije verapamilom verifikovan je u slučajevima tkivne akumulacije, bez obzira na administriranu dozu aluminijuma, pri čemu je istovremeno došlo i do značajnog smanjenja aktivnosti enzima: ALP, LDH, kreatin kinaze i γGT . Aktivnosti enzima koji ukazuju na sindrom nekroze hepatocita, AST i ALT, nisu se statistički značajno smanjile u slučajevima premedikacije verapamilom. Drugi istraživači dokazali su da je u ćelijskoj kulturi hepatocita izloženih aluminijum hloridu redukovana proizvodnja ATP, inhibirana glikoliza, narušena funkcija Krepsovog ciklusa, kao i da postoji značajna oksidacija lipida i proteina (281). Shodno tome, ove metaboličke promene doprinose smanjenju i/ili gubitku funkcije ćelija i predstavljaju značajan patogenetski mehanizam u nastanku i razvoju aluminijumske intoksikacije na mestima njegovog taloženja. Istovremeno je dokazano da hepatocitna akumulacija aluminijuma kod eksperimentalnih pacova nakon oralne primene 20 mg/kg AlCl_3 , tokom 30 dana, dovodi do oksidativnih lezija tkiva jetre, sa posledičnom nekrozom hepatocita i biohemijskim poremećajima u serumu (281,282), odnosno do povećanja aktivnosti ALT, AST, ALP i koncentracije ukupnog bilirubina, kao i

povećanja nivoa ureje u serumu i kreatinina, što je u skladu sa našim rezultatima. Opisane lezije jetre dovode do značajnih metaboličkih promena, sa nastankom hiperglikemije, hipoproteinemije, hiperlipidemije, hiperholesterolemije i hipertrigliceridemije (283). Metabolizam mitohondrija i aerobno disanje predstavljeni su kao centralni entiteti fiziološke funkcije hepatocita, a njihovo oštećenje predstavlja patofiziološku vezu za potencijalnu aktivaciju apoptoze hepatocita.

Mitohondrije u hepatocitima učestvuju u regulaciji nivoa cirkulišućeg “goriva”, kao i metabolita, istovremeno učestvujući u održavanju homeostaze ugljenih hidrata i lipida, biosintetskim reakcijama i metabolizmu aminokiselina. U ćelijskim kulturama hepatocita tretiranih aluminijumom dokazana je disregulacija raspoloživog gvožđa na nivou mitohondrija i značajan porast koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta, što predstavlja odraz aluminijumske toksičnosti (284). Istarživači su potvrdili da hepatociti u kojima je nataložen aluminijum, takođe akumuliraju i sukcinat, što predstavlja patogenetski mehanizam koji prethodi razvoju anaerobnog metabolizma (284). Usled delovanja aluminijuma, dolazi do nakupljanja intermedijernih produkata Krepsovog ciklusa u hepatocitima, remećenja metaboličkih procesa i narušene homeostaze gvožđa, uz evidentan oksidativni stres, koji značajno menja odnose NAD/NADH i NADP/NADPH (285). Mitohondrijska disfunkcija na nivou hepatocita, posledično, dovodi do promocije anaerobioze. Postavljena je hipoteza da aluminijumom indukovani poremećaj metabolizma mitohondrija i dodatni “doprinos” α -ketoglutarata procesu sekvestracije ROS-a stabilizuju hipoksija inducibilni faktor-1 α (HIF-1 α) i da na taj način dolazi do pojačane glikolitičke proizvodnje ATP (281). HIF-1 α je transkripcioni protein, neophodan za ekspresiju gena za glikolizu i stabilizuje se inhibicijom i smanjenjem ekspresije prolil hidrosilaze (PHD). Smanjenje PHD nastaje usled smanjenja α -ketoglutarata, ključnog kofaktora potrebnog za njegovu aktivnost (281). Pretpostavljeno je da se ovde ispoljava ključna uloga aluminijuma, koji inicijalno remeti koncentraciju proteina PHD, te da posrednim putem aluminijum hlorid dovodi do promene koncentracija HIF-1 α . Ukoliko su hepatociti tretirani aluminijumom, u njima dolazi do porasta celularnog HIF-1 α , što je praćeno povećanim preuzimanjem glukoze i stvaranjem ATP-a glikolizom. Takav “influx” glukoze pripisuje se porastu aktivnosti i ekspresiji glukozatransportera-1 (GLUT-1) i heksokinaze (HK), koji su označeni kao “targeti” za delovanje HIF-1 α (286). Veliki broj istraživača slaže se u tome da se toksičnost aluminijuma, u *in vitro* uslovima, ogleda u inhibiciji aktivnosti heksokinaze, jer je dokazano da akutna izloženost hepatocita delovanju AlCl₃ direktno inhibira funkcije heksokinaze i fosfofruktokinaze (286). Ispitivanjem aktivnosti ključnih glikolitičkih enzima neophodnih za proizvodnju ATP-a i održavanje glikolitičkog

“fluksa”, laktat dehidrogenaze (LDH), piruvat kinaze (PK) i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPD), dokazana je njihova povećana aktivnost i ekspresija u ćelijskim kulturama hepatocita tretiranih aluminijum hloridom (284). Naši rezultati ukazuju na značajan porast aktivnosti LDH, što je u skladu sa pomenutim tvrdnjama. Iz tih razloga se pretpostavlja da je, nakon izloženosti aluminijumu, neophodan “metabolički pomak” ka povećanoj glikolizi, kako bi se zadovoljili zahtevi ćelije za ATP-om, jer aluminijum onemogućava aerobno disanje. Ekspozicija aluminijumu dokazano pokazuje efekat stimulacije glikolize, što je u skladu sa već sugerisanim “bifaznim” delovanjem aluminijuma na ćelije domaćina (281-286), što finalno dovodi do metaboličkih promena u hepatocitima, deponovanja masti i lipogeneze.

Poremećaj funkcije mitohondrija u hepatocitima, izazvan aluminijumom, dovodi do preusmeravanja “metabolizovanih” ugljenih hidrata ka biosintezi lipida i akumulaciji triglicerida (281,284,287). Nagomilavanje lipida unutar hepatocita dodatno je omogućeno iscrpljivanjem ćelijskog L-karnitina, mehanizma koji je nedvosmileno indukovano delovanjem aluminijuma (284,287). Poremećaj ciklusa trikarbonskih kiselina dovodi do akumulacije citrata (koji se unosi u citozol) i na koji deluju lipogeni enzimi za stvaranje masnih acilnih grupa. Nakon esterifikacije masnih acil grupa glicerolom, trigliceridi imaju dvostruku ulogu: ili se skladište u citozolu ili se izlučuje u ekstracelularni prostor kao VLDL. Oksidacija masnih kiselina takođe se smanjuje, što se pripisuje smanjenju količine L-karnitina, što je jedna od posledica delovanja aluminijuma (284,287). Dokazano je da je smanjenje L-karnitina u ćelijama tretiranim aluminijumom posledica preusmeravanja ketoglutarata ka procesu eliminacije reaktivnih kiseoničnih vrsta. Smatra se da je aluminijum, kao intracelularni generator oksidativnog stresa, odgovoran za metaboličke perturbacije na nivou hepatocita (ali i neurona) i da je to primarni patofiziološki mehanizam u poremećaju funkcije jetre i nervnih ćelija (284, 287). S obzirom da je u tkivu jetre dokazana značajna apoptoza, a analogno prethodnoj diskusiji, nameće se zaključak da metabolička izmena hepatocita dovodi do disfunkcije mitohondrija i da po prethodno opisanom mehanizmu uvodi hepatocite u programiranu ćelijsku smrt. Za dokazivanje ove hipoteze potrebna su dalja istraživanja na većem uzorku eksperimentalnih životinja uz korišćenje velike palate apoptotskih markera.

Aktuelni pristup za identifikaciju i definisanje ključnih patogenetskih mehanizama nastalih usled toksičnosti aluminijuma polazi od pretpostavke da su mitohondrije ćelija u kojima se akumulira aluminijum (hepatociti) primarna meta toksičnog efekta. Dokazano je da su poremećen aerobni metabolizam i promena strukture i broja mitohondrija esencijalni patofiziološki procesi indukovani aluminijumom i da se nalaze u osnovi nastanka i razvoja bolesti jetre kod osoba koje su hronično izložene njegovom delovanju. Sa patofiziološkog

aspekta ovo je održiva hipoteza, jer su mitohondrije neophodne za proizvodnju energije, homeostazu lipida, metabolizam aminokiselina, regulaciju transkripcije i skladištenje kalcijuma, što je u skladu sa našim rezultatima o protektivnom delovanju blokade kalcijumovih kanala. Da li bi se toksični efekti aluminijuma ublažili ili eliminisali verapamilom u slučajevima humane populacije, na način kako je to dokazano na eksperimentalnim životinjama, ostaje da se verifikuje narednim istraživanjima.

6.7. Patofiziologija protektivnog delovanja blokade kalcijumovih kanala u slučajevima aluminijumske intoksikacije

Na osnovu rezultata dobijenih na našem eksperimentalnom modelu može se govoriti o značajnom protektivnom efektu premedikacije verapamilom, što je u skladu sa izveštajima drugih istraživača (265). Intracelularno preopterećenje kalcijumom evidentno dovodi do smanjenja i/ili gubitka brojnih ćelijskih funkcija, uključujući ekspresiju gena i adheziju i proliferaciju ćelija, a dovodi i do niza metaboličkih poremećaja. Pored toga, dokazano je da je homeostaza Ca^{2+} uključena u promovisanje i/ili inhibiciju apoptoze, tako da svako njeno narušavanje može da dovede do aktivacije apoptoze i programirane smrti ćelija. Oscilacije koncentracija Ca^{2+} smatraju se inicijalnim patogenetskim mehanizmom u aktivaciji apoptoze. Istovremeno je dokazano da intracelularne promene u koncentraciji kalcijuma, osim inicijalnog delovanja, takođe predstavljaju rezultat promena unutar ćelijske membrane nakon što se se indukuje apoptoza, što je i posredno dokazano farmakološkom blokadom kalcijumovih kanala. Postoji više predloženih patogenetskih mehanizama kojima se objašnjava veza između narušene homeostaze kalcijuma i aktivirane apoptoze, pri čemu će ovde biti diskutovani samo najrelevantniji mehanizmi koji se mogu primeniti na naše rezultate.

Kao što je pomenuto, porast koncentracije Ca^{2+} i aktiviran signalni put $Ca^{2+}/CaMKII$ nesumnjivo učestvuju u patogenezi apoptoze u kulturi ćelija izloženih dejstvu aluminijum hlorida (265). Analogno prethodnoj diskusiji da je Bax protein sposoban da stimuliše apoptozu putem oslobađanja citohroma C, dodatno je evidentirano da njegova povišena ekspresija (nakon izlaganja aluminijumu) dovodi do aktivacije mehanizma koji direktno zavisi od promene koncentracija kalcijumovih jona (288). Istovremeno je dokazano (289) da Bcl-2 može da suprimira proces apoptoze, aktivacijom mehanizama koji takođe zavise od homeostaze kalcijuma, a preko membrane endoplazmatskog retikuluma. Pored kalcijuma koji se nalazi u citozolu, mnogi enzimi koji su zavisni od Ca^{2+} , predominantno proteaze i kinaze (kalpain, endonukleaze i protein kinaze zavisne od kalcijuma/kalmodulina) takođe su uključeni u proces

ćelijske apoptoze i deluju kao nizvodni efektori oscilacija u koncentracijama Ca^{2+} (265,290). Kalpain pripada porodici cisteinskih proteaza zavisnih od Ca^{2+} , od kojih su dva izoenzima, m-kalpain (kalpaini I) i m-kalpain (kalpaini II), prisutni unutar svih ćelijskih sistema (290). Iako su homologni, kalpain I i II zahtevaju različite koncentracije Ca^{2+} za aktivaciju *in vitro*. Za sada je identifikovano nekoliko supstrata za kalpain, uključujući p53, kalpastatin i fodrin (290). Kalpain učestvuje u procesu apoptoze cepanjem citoskeletnih proteina kao što su fodrin, aktin i nekih proapoptotskih proteina. Dodatno je dokazano da kalpain može da dovede do cepanja Bax-a i formiranja Bax/p18 fragmenta, koji nakon toga posreduje u oslobađanju citohroma C i samim tim daje proapoptotski stimulus.

Literaturni podaci sugerišu postojanje značajne funkcionalne veze između kalpaina i kaspaza, naročito kaspaze-3. Definisani su supstratni proteini za kalpain i za kaspaze-3 (fodrin, kalpastatin, PARP i tau), ali tačan patogenestki mehanizam njihovog delovanja, niti priroda veze, nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedan od pretpostavljenih mehanizama jeste da kalpain inicira cepanje i inaktivaciju nekoliko kaspaza (7, 8 i 9), pri čemu direktno cepanje kaspaze-9 blokira dATP i citohromom C indukovanu kaspazu-3 (291, 292). Studije su takođe pokazale da kalpain može delovati nezavisno od kaspaze-3 i izazvati apoptozu i bez “uplitanja” kaspaze-3 u različitim eksperimentalnim modelima aktivacija programirane ćelijske smrti (290). Smatra se da verapamil efikasno inhibiše aktivnost kalpaina i da samim tim sprečava cepanje kaspaze-3, čime bi se posredno mogao objasniti protektivan efekat verapamila na našem modelu, a neki autori pretpostavljaju da kalpain i kaspaza-3 učestvuju u patogenezi apoptoze u zavisnosti od stimulusa i vrste ćelijskih linija (291). Limitiranost naše studije ogleda se u tome što u našem modelu nije merena aktivnost kaspaza, tako da se ovakvi zaključci mogu donositi samo posrednim putem.

Druga relevantna hipoteza o patogenezi apoptoze indukovane aluminijumom podrazumeva inicijalnu aktivaciju kalmodulina, malog proteina koji vezuje Ca^{2+} i funkcioniše kao glavni posrednik kalcijumovih signala na nivou svih eukariotskih ćelija (292). Konformacija kalmodulina se menja nakon što se veže za kalcijum, tačnije dolazi do formiranja specifičnog $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kompleksa, koji fosforiliše i aktivira kalmodulin-zavisnu kinazu II (CaMK-II). Aktivirani $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK-II}$ signalni put dokazano posreduje u apoptozi ćelija u ćelijskoj kulturi kojoj je administriran kadmijum (293). Ista grupa autora naknadno je dokazala da se nakon aplikacije AlCl_3 u ćelijskoj kulturi detektuje smanjena ekspresija CaM-a, šta ukazuje na poremećenu homeostazu kalcijuma (265). Pored toga, Al^{3+} i Ca^{2+} imaju slične atomske poluprečnike, pa je moguća interferencija Al^{3+} sa kalmodulinom, što remeti homeostazu kalcijuma Ca^{2+} (294). Pretpostavka je da aluminijum hlorid smanjuje nivoe

kalmodulina povećanjem Ca^{2+} , a da porast kalcijuma promoviše formiranje kompleksa $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i dovodi do smanjenja ekspresije samog kalmodulina.

Formirani $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kompleks omogućava fosforilaciju i aktivaciju CaMKII, pa se porast proteina p-CaMKII objašnjava povećanom ekspresijom $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kompleksa. Aplikacija aluminijum hlorida dovodi do porasta fosforilisanog CaMKII (usled porasta Ca^{2+}), a prekomerna ekspresija p-CaMKII nesumnjivo povećava stepen oksidativnog oštećenja i inicira apoptozu (295). Patofiziološki sled mehanizama podrazumeva inicijalno delovanje aluminijum hlorida, aktivaciju $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}$ signalnog puta, povećan oksidativni stres i promociju apoptoze. Zaključno bi se moglo reći da AlCl_3 indukuje apoptozu remećenjem homeostaze unutarćelijskog Ca^{2+} i aktiviranjem $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}$ signalnog puta, te je i u ovom slučaju opravdana premedikacija verapamilom.

Najnovija istraživanja navode da je narušena homeostaza kalcijuma značajan patogenetski mehanizam za indukciju apoptoze različitih ćelijskih linija, pa se potencijalno može govoriti o protektivnom delovanju verapamila kod pacijenata sa raznovrsnim indikacijama. Uobičajen je stav da teška disregulacija homeostaze Ca^{2+} dovodi do nekroze ćelija, ali se danas sa sigurnošću zna da kontrolisan, čak i diskretan, porast unutarćelijskih koncentracija kalcijuma promoviše ćelijsku smrt putem apoptoze. Otvoreno je pitanje kako takav jednosignalni molekul, kao što je kalcijum, može aktivirati, čak i na nivou samo jedne ćelijske, linije toliko različitih funkcija. Značajno je otkriće da izmena koncentracije kalcijuma predstavlja mehanizam odgovoran za inicijaciju apoptoze, ali i da značajno doprinosi promociji čitavog apoptotskog procesa, uključujući i kasnu fazu programirane ćelijske smrti (296). Homeostaza kalcijuma se remeti dvostruko: “influxom” kalcijuma iz endoplazmatskog retikuluma, ali i prilivom kalcijuma preko njegovih kanala (199), za koje smatramo da se potencijalno mogu blokirati verapamilom, što predstavlja najznačajniji rezultat ovog istraživanja.

Ukoliko je predloženi mehanizam tačan, time se posredno dokazuje protektivan efekat verapamilske premedikacije, ali je svakako neophodna postavka novih eksperimentalnih modela sa velikim brojem eksperimentalnih uzoraka, za donošenje definitivnog zaključka o patogenetskim mehanizmima apoptoze indukovane aluminijumom i protektivnom efektu blokade kalcijumovih kanala.

7.0. ZAKLJUČAK

- Dokazano je da hronična administracija aluminijuma dovodi do značajnih promena hematoloških i biohemijskih parametara sa izraženim dozno-zavisnim karakterom.
- Verifikovane hematološke promene bile su pojava mikrocitno-hipohromne anemije, leukocitoza i trombocitoza i povišene vrednosti hepcidina i feritina.
- Biohemijske abnormalnosti vezane za intokcikaciju Al bile su visoke vrednosti markera inflamacije i svi parametri nekroze hepato-bilijarnog trakta.
- Utvrđeno je da premedikacija verapamilom dovodi do statistički značajnog poboljšanja hematološkog i biohemijskog fenotipa.
- Istovremeno je dokazano značajno taloženje aluminijuma u tkivu jetre, bubrega i testisa.
- Premedikacija verapamilom dovela je do statistički značajnog smanjenja taloženja aluminijuma u pomenutim tkivima.
- Imunohistohemijskim bojenjem dokazana je visoka ekspresija proapoptotskih markera Bax i Bid, koja je bila najizraženija u tkivu testisa.
- Utvrđen je visok stepen apoptoze izražen proapoptotskim markerima Bax i Bid u mladim ćelijama germinativnog epitela, ali i u Lejdigovim ćelijama.
- Dokazano je da su sve promene bile ublažene u slučajevima premedikacije verapamilom.
- Premedikacija verapamilom nije dovela do značajnih promena u ekspresiji antiapoptotskog markera Bcl-2 ni u jednoj ispitivanoj grupi.

8.0. LITERATURA

1. Ingenito A, Bruno C. Using aluminum for space propulsion. *J Propuls Power* 2004;20:1056-63.
2. World Health Organization & International Programme for Chemical Safety. Aluminium. World Health Organization, 1997.
3. Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2007;10(Suppl 1):1-269.
4. <https://www.mindat.org/element/Aluminium>
5. <http://webmineral.com/data/Aluminum.shtml#.YGpAX-gza8U>
6. <https://www.statista.com/statistics/264964/production-of-bauxite>. Leading aluminum producers worldwide by production output 2019 Published by Statista Research Department, May 13, 2020.
7. Norris TL, Gancarz AJ, Rokop DJ, Thomas KW. Half-life of ^{26}Al . *Journal of Geophys Res* 1983;88:B331-3.
8. Davitoiu AM, Truta E, Mitu AM, Bojescu AA, Grama F, Ionica M. The role of aluminum in the symptomatology of attention deficit hyperactivity disorder children. *Res Sci Today* 2018;1:115-25.
9. http://www.farlang.com/gemstones/smith-gems-prec-stones/page_028. Gems and Precious Stones.
10. Nappi C. The global aluminium industry 40 years from 1972. *World Aluminium* 2013 Feb:1-27.
11. Mills I, Cvitaš T, Homann K, Kallay N, Kuchitsu K. Quantities, units and symbols in physical chemistry. 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1993.
12. Weeks ME, Leicester HM. Discovery of the elements. *J Chem Educ* 1968:557-79.
13. Authier-Martin M, Forte G, Ostap S, See J. The mineralogy of bauxite for producing smelter-grade alumina. *JOM* 2001;53:36-40.
14. <https://www.aluminum.org/aluminum-advantage/history-aluminum>
15. <http://www.world-aluminium.org/statistics/#map>. Primary aluminium production in 2020.

16. Crisponi G, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Nurchi VM, Crespo-Alonso M, et al. The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases. *Biomol Concepts* 2013;4:77-87.
17. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1998.
18. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Summary Table. Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, February 2017.
19. EFSA (European Food Safety Authority): Safety of aluminium from dietary intake, scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). *EFSA Journal* 2008:1-34.
20. Becaria A, Campbell A, Bondy SC. Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health* 2002;18:309-20.
21. Kucharczak E, Moryl A. Contents of metals in cultivated plants in Zgorzelec-Bogatynia region. Part 1. Lead, cadmium, aluminium. *Ochr Sr Zasobów Nat* 2010;42:52-61.
22. Zołotajkin M, Ciba J, Kluczka J, Skwira M, Smoliński A. Exchangeable and bioavailable aluminium in the mountain forest soil of Barania Góra range (Silesian Beskids, Poland). *Water Air Soil Pollut* 2011;216:571-80.
23. Exley C. A biogeochemical cycle for aluminium? *J InorgBiochem* 2003;97:1-7.
24. Exley C. The chemistry of human exposure to aluminium. *Adv Exp Med Biol* 2018;1091:33-7.
25. Exley C. Human exposure to aluminium. *Environ Sci Process Impacts* 2013;15:1807-16.
26. Ingberman L, Jones DG, Keith S, Rosemond ZA. Toxicological profile for aluminum. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, September 2008.
27. Goncharuk VV, Lapshin VB, Chichaeva MA, Matveeva IS, Samsoni-Todorov AO, Taranov VV, et al. Heavy metals, aluminum, and arsenic in aerosols of the world ocean. *J Water Chem Technol* 2012;34:1-10.
28. Varrica D, Aiuppa A, Dongarrà G. Volcanic and anthropogenic contribution to heavy metal content in lichens from Mt. Etna and Vulcano island (Sicily). *Environ Pollut* 2000;108:153-62.

29. Polizzi S, Ferrara M, Bugiani M, Barbero D, Baccolo T. Aluminium and iron air pollution near an iron casting and aluminium foundry in Turin district (Italy). *J Inorg Biochem* 2007;101:1339-43.
30. Liu W, Bai C, Liu Q, Zao J. A study on the influencing factors and trends of the falling extra-fine aluminium flake dust generation rate. *Powder Technol* 2020;369:88-95.
31. Exley C, Begum A, Woolley MP, Bloor RN. Aluminum in tobacco and cannabis and smoking-related disease. *Am J Med* 2006;119:276.e9-11.
32. Exley C, Ahmed U, Polwart A, Bloor RN. Elevated urinary aluminium in current and past users of illicit heroin. *Addict Biol* 2007;12:197-9.
33. Pappas RS, Watson CH, Valentin-Blasini L. Aluminum in tobacco products available in the United States. *J Anal Toxicol* 2018;42:637-41.
34. Koutela N, Fernández E, Saru ML, Psillakis E. A comprehensive study on the leaching of metals from heated tobacco sticks and cigarettes in water and natural waters. *Sci Total Environ* 2020;714:136700.
35. Krupinska I. Aluminium drinking water treatment residuals and their toxic impact on human health. *Molecules* 2020;25:641.
36. Meghzili B, Souad B, Abdelkrim A. Risk of residual aluminum in treated waters with aluminum sulphate. *Adv Res* 2016;6:1-8.
37. Krupinska I. Effect of temperature and pH on the effectiveness of pollutant removal from groundwater in the process of coagulation. *Ochrona Srodowiska* 2015;37:35-42.
38. Oram B. Secondary Drinking Water Standards: Guidance for Nuisance Chemicals|Drinking Water Contaminants–Standards and Regulations; US EPA, Publisher: Washington DC, USA, 19 January 2017. Available online: <https://water-research.net/index>
39. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum. 2017. Available online: https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/drinkingwater-quality-guidelines-4-including-1st-addendum/en/ (accessed on 30 January 2020).
40. Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće ("Sl. list SRJ", br. 42/98 i 44/99).
41. Igbokwe IO, Igwenagu E, Igbokwe NA. Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. *Interdiscip Toxicol* 2019;12:45-70.
42. WHO Technical Report Series 966. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food

- Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-fourth (74th) report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization. Rome, Italy, 2011.
43. López FF, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Aluminium levels in spices and aromatic herbs. *Sci Total Environ* 2000;257:191-7.
 44. Stahl T, Falk S, Rohrbeck A, Georgii S, Herzog C, Wiegand A, Hotz S, Boschek B, Zorn H, Brunn H. Migration of aluminum from food contact materials to food—a health risk for consumers? Part I of III: exposure to aluminum, release of aluminum, tolerable weekly intake (TWI), toxicological effects of aluminum, study design, and methods. *Environ Sci Eur*. 2017;29(1):19.
 45. Stahl T, Falk S, Taschan H, Boschek B, Brunn H. Evaluation of human exposure to aluminum from food and food contact materials. *Eur Food Res Technol* 2018;244:2077-84.
 46. Ai-Ashmawy MAM. Prevalence and public health significance of aluminium residues in milk and some dairy products. *J Food Sci* 2011;76:T73-6.
 47. Filippini M, Baldisserotto A, Menotta S, Fedrizzi G, Rubini S, Gigliotti D, et al. Heavy metals and potential risks in edible seaweed on the market in Italy. *Chemosphere* 2021;263:127983.
 48. Fermo P, Soddu G, Miani A, Comite V. Quantification of the aluminum content leached into foods baked using aluminum. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:8357.
 49. Duggan JM, Dickeson JE, Tynan PF, Houghton A, Flynn JE. Aluminium beverage cans as a dietary source of aluminium. *Med J Aust* 1992;156:604-5.
 50. Stahl T, Falk S, Rohrbeck A, Georgii S, Herzog C, Wiegand A, et al. Migration of aluminum from food contact materials to food – a health risk for consumers? Part II of III: migration of aluminum from drinking bottles and moka pots made of aluminum to beverages. *Environ Sci Eur* 2017;29:18.
 51. Stahl T, Falk S, Rohrbeck A, Georgii S, Herzog C, Wiegand A, et al. Migration of aluminum from food contact materials to food – a health risk for consumers? Part III of III: migration of aluminum to food from camping dishes and utensils made of aluminum. *Environ Sci Eur* 2017;29:17
 52. Ertl K, Goessler W. Aluminium in foodstuff and the influence of aluminium foil used for food preparation or short time storage. *Food Addit Contam Part B Surveill* 2018;11:153-9.

53. Regulation No. 1333/2008 (2008) Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives.
54. Regulation No. 380/2012 (2012) Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 3 May 2012.
55. WHO technical report series 940. FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: Sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, Italy, 2007:45-8.
56. Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) Risk assessment of the exposure to aluminium through food and the use of cosmetic products in the Norwegian population VKM Report 2013:20.
57. Redgrove J, Rodriguez I, Mahadevan-Bava S, Exley C. Prescription infant formulas are contaminated with aluminium. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16:899.
58. Tietz T, Lenzner A, Kolbaum AE, Zellmer S, Riebeling C, Gürtler R, et al. Aggregated aluminium exposure: risk assessment for the general population. *Arch Toxicol* 2019;93:3503-21.
59. Pineau A, Fauconneau B, Sappino AP, Deloncle R, Guillard O. If exposure to aluminium in antiperspirants presents health risks, its content should be reduced. *J Trace Elem Med Biol* 2014;28:147-50.
60. Reinke CM, Breitzkreutz J, Leuenberger H. Aluminium in over-the-counter drugs. *Drug Saf* 2003;26:1011-25.
61. Advenier E, Landry C, Colomb V, Cognon C, Pradeau D, Florent M, Goulet O, Ricour C, Corriol O. Aluminum contamination of parenteral nutrition and aluminum loading in children on long-term parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:448-53.
62. Corkins MR. Committee on Nutrition. Aluminum Effects in Infants and Children. *Pediatrics* 2019;144:e20193148.
63. Kazi TG, Khan S, Baig JA, Kolachi NF, Afridi HI, Shah AQ. Determination of trace quantity of aluminium in dialysate concentrates using solid phase and cloud point extraction methods. *Anal Methods* 2010;2:558-63.
64. Jaffe JA, Liftman C, Glickman JD. Frequency of elevated serum aluminum levels in adult dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;46:316-9.
65. Chan S, Au K, Francis RS, Mudge DW, Johnson DW, Pillans PI. Phosphate binders in patients with chronic kidney disease. *Aust Prescr* 2017;40:10-4.

66. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2017;7:1-59.
67. Mudge DW, Johnson DW, Hawley CM, Campbell SB, Isbel NM, van Eps CL, et al. Do aluminium-based phosphate binders continue to have a role in contemporary nephrology practice? *BMC Nephrology* 2011;12:1-8.
68. Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks (SCHEER). Final opinion on tolerable intake of aluminium with regards to adapting the migration limits for aluminium in toys. Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks, 2017.
69. Berthon G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord Chem Rev* 2002;228:319-41.
70. Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child* 1984;54:236-41.
71. Taylor GA, Ferrier IN, Mc Loughlin IJ, Fairbairn AF, McKeith IG, Lett D, Edwardson JA. Gastrointestinal absorption of aluminium in Alzheimer's disease: response to aluminium citrate, *Age Ageing* 1992;21:81-90.
72. Moore PB, Day JP, Taylor GA, Ferrier IN, Fifield LK, Edwardson JA. Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. *Dement Ger Cogn Dis* 2000;11:66-9.
73. Moore PB, Edwardson JA, Ferrier IN, Taylor GA, Lett D, Tyrer SP, et al. Gastrointestinal absorption of aluminum is increased in Down's syndrome. *Biol Psychiatry* 1997;41:488-92.
74. Jugdaohsingh R, Reffitt DM, Oldham C, Day JP, Fifield LK, Thompson RP, et al. Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2000;71:944-9.
75. Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Almeida CM. Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods Hum Nutr* 2007;62:139-44.
76. Van der Voet GB, de Wolff FA. Intestinal absorption of aluminum: effect of sodium and calcium. *Arch Toxicol* 1998;72:110-4.
77. Perl DP, Good PF. Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. *Lancet* 1987;1:1028.

78. Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, et al. Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol* 2002;30:373-89.
79. Divine KK, Lewis JL, Grant PG, Bench G. Quantitative particle-induced X-ray emission imaging of rat olfactory epithelium applied to the permeability of rat epithelium to inhaled aluminum. *Chem Res Toxicol* 1999;12:575-81.
80. Taiwo OA. Diffuse parenchymal diseases associated with aluminum use and primary aluminum production. *J Occup Environ Med* 2014;56(5 Suppl):S71-S72.
81. Kraus T, Schaller KH, Angerer J, Hilgers RD, Letzel S. Aluminosis – detection of an almost forgotten disease with HRCT. *J Occup Med Toxicol* 2006;1:1-9.
82. Klotz K, Weistenhöfer W, Neff F, Hartwig A, van Thriel C, Drexler H. The health effects of aluminum exposure. *Dtsch Arztebl Int* 2017;114:653-9.
83. Flarend R, Bin T, Elmore D, Hem SL. A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem Toxicol* 2001;39:163-8.
84. de Ligt RD, van Duijn E, Grossouw D, Bosgra S, Burggraaf J, Windhorst A, et al. Assessment of dermal absorption of aluminum from a representative antiperspirant formulation using a ²⁶Al microtracer approach. *Clin Transl Sci* 2018;6:573-81.
85. Pineau A, Guillard O, Fauconneau B, Favreau F, Marty MH, Gaudin A, et al. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell. *J Inorg Biochem* 2012;110:21-6.
86. Food and Drug Administration. Aluminum in large and small volume parenterals used in total parenteral nutrition. *Fed Regist* 2000;65:4103-11.
87. Goullé JP, Grangeot-Keros L. Aluminum and vaccines: current state of knowledge. *Méd Mal Infect* 2020;50:16-21.
88. Iyengar GV. Reevaluation of the trace element content in reference man. *Radiat Phys Chem* 1998;51:545-60.
89. Bagepally BS, Balachandar R, Kalahasthi R, Tripathi R, Haridoss M. Association between aluminium exposure and cognitive functions: a systematic review and meta-analysis. *Chemosphere* 2021;268:128831.
90. Genuis SJ, Birkholz D, Rodushkin I, Beeson S. Blood, urine, and sweat (BUS) study: monitoring and elimination of bioaccumulated toxic elements. *Arch Environ Cont Toxicol* 2011;61:344-57.
91. Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive

- decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol* 2009;169:489-96.
92. Maya S, Prakash T, Madhu KD, Goli D. Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomed Pharmacother* 2016;83:746-54.
93. Mold M, Umar D, King A, Exley C. Aluminium in brain tissue in autism. *J Trace Elem Med Biol* 2018;46:76-82.
94. Walton JR. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 2006;27:385-94.
95. Bhattacharjee S, Zhao Y, Hill JM, Culicchia F, Kruck TP, Percy ME, et al. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem* 2013;126:35-7.
96. Exley C, Vickers T. Elevated brain aluminum and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminum: a case report. *J Med Case Rep* 2014;8:41.
97. Fujiwara T, Morisaki N, Honda Y, Sampei M, Tani Y. Chemicals, nutrition, and autism spectrum disorder: a mini-review. *Front Neurosci* 2016;10:174.
98. Sealey LA, Hughes BW, Sriskanda AN, Guest JR, Gibson AD, Johnson-Williams L, et al. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environ Int* 2016;88:288-98.
99. Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides* 2002;23:1311-5.
100. Sawicki K, Czajka M, Matysiak-Kucharek M, Fal B, Drop B, Męczyńska-Wielgosz S et al. Toxicity of metallic nanoparticles in the central nervous system. *Nanotechnology Reviews* 2019;8:175-200.
101. Justin Thenmozhi A, Raja TR, Janakiraman U, Manivasagam T. Neuroprotective effect of hesperidin on aluminium chloride induced Alzheimer's disease in wistar rats. *Neurochem Res* 2015;40:767-76.
102. Justin Thenmozhi A, Dhivyabharathi M, William Raja TR, Manivasagam T, Essa MM. Tannoid principles of *Emblca officinalis* renovate cognitive deficits and attenuate amyloid pathologies against aluminum chloride induced rat model of Alzheimer's disease. *Nutr Neurosci* 2016;19:269-78.
103. Abdel-Aal RA, Assi AA, Kostandy BB. Rivastigmine reverses aluminum-induced behavioral changes in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;659:169-76.

104. Martinez CS, Vera G, Ocio JAU, Peçanha FM, Vassallo DV, Miguel M, et al. Aluminum exposure for 60days at an equivalent human dietary level promotes peripheral dysfunction in rats. *J Inorg Biochem.* 2018;181:169-76.
105. Phelps KR, Naylor K, Brien TP, Wilbur H, Haqqie SS. Encephalopathy after bladder irrigation with alum: case report and literature review. *Am J Med Sci* 1999;318:181-5.
106. Altmann P, Cunningham J, Dhanesha U, Ballard M, Thompson J, Marsh F. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *BMJ* 1999;319:807- 11.
107. Polizzi S, Pira E, Ferrara M, Bugiani M, Papaleo A, Albera R, et al. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 2002;23:761-74.
108. Lu XT, Xu SM, Zhang YW, Gao D, Yang H, Song J, et al Longitudinal study of the effects of occupational aluminium exposure on workers' cognition. *Chemosphere* 2021;271:129569.
109. Meng H, Wang S, Guo J, Zhao Y, Zhang S, Zhao Y, et al. Cognitive impairment of workers in a large-scale aluminium factory in China: a cross-sectional study. *BMJ open* 2019;9(6):e027154
110. Wang S, Meng H, Shang N, Guo J, Zhang T, Zhang S, Zhao Y, Zhang H, Zhang Q, Niu Q. The Relationship between Plasma Al Levels and Multi-domain Cognitive Performance among In-service Aluminum-exposed Workers at the SH Aluminum Factory in China: A Cross-sectional Study. *Neurotoxicology.* 2020;76:144-52.
111. Fulgenzi A, Vietti D, Ferrero ME. Aluminium involvement in neurotoxicity. *Biomed Res Int* 2014;2014:758323
112. Mirza A, King A, Troakes C, Exley C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease, *J Trace Elem Med Biol* 2017;40:30-6.
113. Exley C, Clarkson E. Aluminium in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: A comparison with Alzheimer's disease, multiple sclerosis and autism. *Sci Rep* 2020;10:7770.
114. Exley C, Mold MJ. Imaging of aluminium and amyloid β in neurodegenerative disease. *Heliyon* 2020;6(4):e03839.
115. Boretti A. Reviewing the association between aluminum adjuvants in the vaccines and autism spectrum disorder. *J Trace Elem Med Biol* 2021;66:126764.

116. Couette M, Boisse MF, Maison P, Brugieres P, Cesaro P, Chevalier X, et al. Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. *J Inorg Biochem* 2009;103:1571-8.
117. Glanz JM, Newcomer SR, Daley MF, McClure DL, Baxter RP, Jackson ML, et al. Cumulative and episodic vaccine aluminum exposure in a population-based cohort of young children. *Vaccine* 2015;33:6736-44.
118. Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med* 2007;9:83-100.
119. Israeli E. Gulf War syndrome as a part of the autoimmune (autoinflammatory) syndrome induced by adjuvant (ASIA). *Lupus* 2012;21:190-4.
120. World Health Organization. Global Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS). Statement from the Global Advisory Committee on Vaccine Safety on aluminium-containing vaccines. 2008. "cited 2020 May 5" Available from: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/aluminium/statement_112002/en/
121. Kongerud J, Søyseth V. Respiratory disorders in aluminium smelter workers. *J Occup Environ Med* 2014;56(5S):S60–70.
122. Donoghue AM, Frisch N, Ison M, Walpole G, Capil R, Curl C, et al. Occupational asthma in the aluminum smelters of Australia and New Zealand: 1991–2006. *Am J Ind Med* 2010;54:224–31.
123. Shaaban LH, Zayet HH, Aboufaddan HH, Elghazally SA. Respiratory hazards: clinical and functionai assessment in aluminum industry workers. *Egypt J Chest Dis Tuberc* 2016;65:537-43.
124. Długaszek M, Fiejka MA, Graczyk A, Aleksandrowicz JC, Słowikowska M. Effects of various aluminium compounds given orally to mice on Al tissue distribution and tissue concentrations of essential elements. *PharmacolToxicol* 2000;86:135-9.
125. Chappard D, Bizot P, Mabileau G, Hubert L. Aluminum and bone: review of new clinical circumstances associated with Al⁽³⁺⁾ deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie* 2016;100(329):95-105.
126. Klein GL. Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect? *Osteoporos Sarcopenia* 2019;5:2-5.

127. Díaz-Corte C, Fernández-Martín JL, Barreto S, Gómez C, Fernández-Coto T, Braga S, et al. Effect of aluminium load on parathyroid hormone synthesis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:742-5.
128. Cao Z, Liu D, Zhang Q, Sun X, Li Y. Aluminum chloride induces osteoblasts apoptosis via disrupting calcium homeostasis and activating Ca⁽²⁺⁾/CaMKII Signal Pathway. *Biol Trace Elem Res* 2016;169:247-53.
129. Mahieu S, del Carmen Contini M, Gonzalez M, Millen N, Elias MM. Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicol Lett* 2000;111:235-42
130. Zhang L, Li X, Gu Q, Zhu Y, Zhao H, Li Y, et al. Effects of subchronic aluminum exposure on serum concentrations of iron and iron-associated proteins in rats. *Biol Trace Elem Res* 2011;141:246-53.
131. Jeffery EH, Abreo K, Burgess E, Cannata J, Greger JL. Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney. *J Toxicol Environ Health* 1996;48:649-65.
132. Schroeder TM, Schroeder TM, Caspers ML. Kinetics of aluminum-induced inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase in vitro. *Biochem Pharmacol* 1996; 52(6):927-31.
133. Pérez G, Pregi N, Vittori D, Di Risio C, Garbossa G, Nesse A. Aluminum exposure affects transferrin-dependent and -independent iron uptake by K562 cells. *BiochimBiophys Acta* 2005;1745(1):124-30.
134. Carlsen E, Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;305:609-13.
135. Sengupta P, Borges E Jr, Dutta S, Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Hum Exp Toxicol* 2018;37:247-55.
136. Merzenich H, Zeeb H, Blettner M. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health* 2010;10:24.
137. Guo C, Huang C, Chen S, Wang Hsu G. Serum and testicular testosterone and nitric oxide products in aluminum treated mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;10:53-60.
138. Yousef MI, El-Morsy AM, Hassan MS. Aluminium induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 2005;215:97-107.
139. Abdel-Moneim AM. Effects of taurine against histomorphological and ultrastructural changes in the testes of mice exposed to aluminium chloride. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;64:405-14.

140. Yousef MI, Kamel KI, El-Guendi MI, El-Demerdash FM. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: The protective role of some antioxidants. *Toxicology* 2007;239:213-23.
141. El-Demerdash FM. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J Trace Elem Med Biol* 2004;18:113-21.
142. Popović N, Morales-Delgado N, Vidal Mena D, Alonso A, Pascual Martínez M, Caballero Bleda M, Popović M. Verapamil and Alzheimer's disease: past, present, and future. *Front Pharmacol* 2020;11:562.
143. Miska-Schramm A, Kapusta J, Kruczek M. The effect of aluminum exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodesglareolus*). *Biol Trace Elem Res* 2017;17:97-106.
144. Trif A, Muselin F, Argherie D, Dumitrescu E, Macinic I. The consequences of chronic exposure to aluminium on some morphological biomarkers of reproductive function (body, genital organs, sexual accessory glands weight, seminiferous tubules diameter) in male rats. *Luc Stin Med Vet* 2007;40:652-8.
145. Mouro VGS, Menezes TP, Lima GDA, Domingues RR, Souza ACF, Oliveira JA, et al. How bad is aluminum exposure to reproductive parameters in rats? *Biol Trace Elem Res* 2018;183:314-24.
146. Llobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, Domingo JL, Corbella J. Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Fund Appl Toxicol* 1995;25:45-51.
147. Zhang Q, Ding Y, He K, Li H, Gao F, Moehling TJ, et al. Exposure to alumina nanoparticles in female mice during pregnancy induces neurodevelopmental toxicity in the offspring. *Front Pharmacol* 2018;9:253.
148. Mohammed A, Mayyas I, Elbetieha A, Shoter A, Khamas W, Elnasser Z. Toxicity evaluation of aluminium chloride on adult female mice. *J Anim Vet Adv* 2008;7:552-6.
149. Fu Y, Jia FB, Wang J, Song M, Liu SM, Li YF, et al. Effects of sub-chronic aluminum chloride exposure on rat ovaries. *Life Sci* 2014;100:61-6.
150. Trif A, Dumitrescu E, Muselin F. Aluminium sulphate impact on some markers of female reproductive system performances (litter size, sex ratio) and of physical development (vaginal opening) in rats. *Bull USAMV Vet Med* 2008;65:97-106.
151. Chinoy NJ, Patel TN. Effects of sodium fluoride and aluminium chloride on ovary and uterus of mice and their reversal by some antidotes. *Fluoride* 2001;34:9-20.

152. Marwa M, Adrian F, Nedra B, Samira M, Horea M, Walid-Habib T, et al. The role of lysosomes in the phenomenon of concentration of aluminum and indium in the female reproductive system. An ultrastructural study. *J Trace Elem Med Biol* 2017;44:59- 64.
153. Agarwal DR, Gupta SB. An alarming hazard in the community using aluminium in day to day life on the basis of toxic effects on the liver of Albino rats by ingestion of aluminium. *Nat J Comm Med* 2010;1:82-4.
154. Cheraghi E, Roshanaei K. The protective effect of curcumin against aluminum chloride induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Pharm Biomed Res* 2019;5:6-13.
155. Lewandowska-Szumiel M, Komender J. Aluminium release as a new factor in the estimation of alumina bioceramic implants. *Clin Mater* 1990;5:167-75.
156. Klein GL, Sedman AB, Heyman MB, Marathe G, Battifora HA, Worrall JL. Hepatic abnormalities associated with aluminum loading in piglets. *J Parenter Enter Nutr* 1987;11:293-7.
157. Klein GL, Goldblum RM, Moslen MT, Pyron DL, Mann PA, Lee TC, et al. Increased biliary transferrin excretion following parenteral aluminium administration to rats. *Pharmacol Toxicol* 1993;72:373-6.
158. Bidlack WR, Bidlack WR, Brown RC, Meskin MS, Lee TC, Klein GL. Effect of aluminum on the hepatic mixed function oxidase and drug metabolism. *Drug Nutr Interact* 1987;5:33-42.
159. Willhite CC, Karyakina NA, Nordheim E, Arnold I, Armstrong V, Momoli F, et al. The REACH registration process: A case study of metallic aluminium, aluminium oxide and aluminium hydroxide. *Neurotoxicology*. 2021;83:166-78.
160. Mirick DK, Davis S, Thomas DB. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1578-80.
161. Monteiro-Riviere NA, Oldenburg SJ, Inman AO. Interactions of aluminum nanoparticles with human epidermal keratinocytes. *J Appl Toxicol* 2010;30:276-85.
162. Vogelbruch M, Nuss B, Körner M, Kapp A, Kiehl P, Bohm W. Aluminium-induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations. *Allergy* 2000;55:883-7.
163. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 2008;128:501-23.
164. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283:65-87.

165. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl* 2008;29:488-98.
166. Pandey G, Jain GC. A review on toxic effects of aluminium exposure on male reproductive system and probable mechanisms of toxicity. *International Journal of Toxicology and Applied Pharmacology* 2013;3:48-57.
167. Guo CH, Lin CY, Yeh MS, Hsu GS. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice, *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;19:33-40.
168. Mahdi AA, Tripathi S, Neerja J, Hasan M. Aluminium mediated oxidative stress: possible relationship to cognitive impairment of Alzheimer's type. *Ann Neurosci* 2006;13:19-24.
169. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic Biol Med* 2002;33:1037-46.
170. Yokel RA. Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environ Health Perspect* 2002;110(Suppl 5):699-704.
171. Sheeran FL, Sheeran FL, Pepe S. Mitochondrial bioenergetics and dysfunction in failing heart. *Adv Exp Med Biol* 2017;982:65-80.
172. Moumen R, Ait-Oukhatar N, Bureau F, Fleury C, Bouglé D, Arhan P, et al. Aluminum increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:89-93.
173. El-Gendy AM. Amelioration of Aluminium - intake oxidative stress by some antioxidants in male albino rats. *Egypt J Hosp Med* 2011;45:536-46.
174. Murakami K, Yoshino M. Aluminum decreases the glutathione regeneration by the inhibition of NADP-isocitrate dehydrogenase in mitochondria. *J Cell Biochem* 2004;93:1267-71.
175. Orihuela D, Meichtry V, Prego N, Pizarro M. Short-term oral exposure to aluminium decreases glutathione intestinal levels and changes enzyme activities involved in its metabolism. *J Inorg Biochem* 2005;99:1871-8.
176. Mujika JI, Dalla Torre G, Formoso E, Grande-Aztatzi R, Grabowski SJ, Exley C, et al. Aluminum's preferential binding site in proteins: sidechain of amino acids versus backbone interactions. *J Inorg Biochem* 2018;181:111-6.
177. Ahn S, Matsumoto H. The role of the plasma membrane in the response of plant roots to aluminum toxicity. *Plant Signal Behav* 2006;1(2):37-45.

178. Deleers M, Servais JP, Wülfert E. Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. *Biochim Biophys Acta* 1986;855:271-6.
179. Belaïd-Nouira Y, Bakhta H, Bouaziz M, Flehi-Slim I, Haouas Z, Ben Cheikh H. Study of lipid profile and parieto-temporal lipid peroxidation in AlCl₃ mediated neurotoxicity. Modulatory effect of fenugreek seeds. *Lipids Health Dis* 2012;11:16.
180. Song Y, Xue Y, Liu X, Wang P, Liu L. Effects of acute exposure to aluminum on blood-brain barrier and the protection of zinc. *Neurosci Lett* 2008;445:42-6.
181. Capone R, Quiroz FG, Prangio P, Saluja I, Sauer AM, Bautista MR, et al. Amyloid- β -induced ion flux in artificial lipid bilayers and neuronal cells: resolving a controversy. *Neurotox Res* 2009;16:1-13.
182. Cochran M, Goddard G, Ludwigson N. Aluminum absorption by rat duodenum: further evidence of energy-dependent uptake. *Toxicol Lett* 1990;51:287-94.
183. Haug A, Haug A, Shi B, Vitorello V. Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch Toxicol* 1994;68:1-7.
184. Johnson GV, Jope RS. Aluminum alters cyclic AMP and cyclic GMP levels but not presynaptic cholinergic markers in rat brain in vivo. *Brain Res* 1987;403:1-6.
185. Mundy WR, Kodavanti PR, Dulchinos VF, Tilson HA. Aluminum alters calcium transport in plasma membrane and endoplasmic reticulum from rat brain. *J Biochem Toxicol* 1994;9:17-23.
186. Kaur A, Gill KD. Disruption of neuronal calcium homeostasis after chronic aluminium toxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:118-22.
187. Platt B, Büsselberg D. Actions of aluminum on voltage-activated calcium channel currents. *Cell Mol Neurobiol* 1994;14:819-29.
188. Ochmanski W, Barabasz W. Aluminum--occurrence and toxicity for organisms. *Przegl Lek* 2000;57:665-8.
189. Middaugh J, Middaugh J, Hamel R, Jean-Baptiste G, Beriault R, Chenier D, et al. Aluminum triggers decreased aconitase activity via Fe-S cluster disruption and the overexpression of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase: a metabolic network mediating cellular survival. *J Biol Chem* 2005;280:3159-65.
190. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potentials. *Pharmacol Rev* 2016;67:821-70.

191. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(8):a003947.
192. Zhou Y, Greka A. Calcium-permeable ion channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016;310(11):1157-1167.
193. Weiss N, Zamponi GW. Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal* 2017;1(1):NS20160003.
194. Perez-Reyes E, Van Deusen AL, Vitko I: Molecular pharmacology of human Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels: block by antihypertensives, antiarrhythmics, and their analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328:621-7.
195. Bergson P, Lipkind G, Lee SP, Duban ME, Hanck DA. Verapamil block of T-type calcium channels. *Mol Pharmacol* 2011;79:411-9.
196. Striessnig J, Ortner NJ, Pinggera A: Pharmacology of L-type calcium channels: novel drugs for old targets? *Curr Mol Pharmacol* 2015;8:110-22.
197. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018;25:65-80.
198. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:378-90.
199. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(50):6407-18.
200. Banni M, Messaoudi I, Said L, El Heni J, Kerkeni A, Said K. Metallothionein in gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Arch Environ Contam Toxicol* 2010;59:513-9.
201. Bohrer D, Bassan MD, Kaizer R, do Nascimento PC, Schetinger MRC, Morsch VM, et al. Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies. *Anal Biochem* 2008;377:120-7.
202. Mermet JM. Trends in instrumentation and data processing in ICP-AES. Plenary lecture. *J Anal At Spectrom* 2002;17:1065-71.
203. Chandran S, Singh SP. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie* 2007;62:4-14.
204. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL <http://www.r-project.org>

205. Yokel RA. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimer Dis* 2006;10:223-53.
206. Yu H, Zhang J, Ji Q, Yu H, Wang P, Song M, et al. Melatonin alleviates aluminium chloride-induced immunotoxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis associated with the activation of Nrf2 signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019;173:131-41.
207. Milnerowicz H, Ściskalska M, Dul M. Pro-inflammatory effects of metals in persons and animals exposed to tobacco smoke. *J Trace Elem Med Biol* 2015;29:1-10.
208. Mujika JI, Torre GD, Formoso E, Grande-Aztatzi R, Grabowski SJ, Exley C, et al. Aluminum's preferential binding site in proteins: side chain of amino acids versus backbone interactions. *J Inorg Biochem* 2018;181:111-6.
209. Nam SM, Kim JW, Yoo DY, Kim W, Jung HY, Hwang IK, et al. Additive or synergistic effects of aluminum on the reduction of neural stem cells, cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of high-fat diet-fed mice. *Biol Trace Elem Res* 2014;157:51-9.
210. Kaur A, Gill KD. Disruption of neuronal calcium homeostasis after chronic aluminium toxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:118-22.
211. Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004184.
212. Dua R, Gill KD. Effect of aluminium phosphide exposure on kinetic properties of cytochrome oxidase and mitochondrial energy metabolism in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 2004;1674:4-11.
213. Bergson P, Lipkind G, Lee SP, Duban ME, Dorothy A, Hanck DA. Verapamil block of T-type calcium channels. *Mol Pharmacol*. 2011;79:411-9.
214. D'Souza SP, Vijayalaxmi KK, Naik P. Assessment of genotoxicity of aluminium acetate in bone marrow, male germ cells and fetal liver cells of Swiss albino mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014;766:16-22.
215. Ganz T. Anemia of inflammation. *N Engl J Med* 2019;381:1148-57.
216. Zhang Q, Cao Z, Sun X, Zuang C, Huang W, Li W. Aluminum trichloride induces hypertension and disturbs the function of erythrocyte membrane in male rats. *Biol Trace Elem Res* 2016;171:116-23.

217. Xu F, Liu Y, Zhao H, Yu K, Song M, Zhu Y, et al. Aluminum chloride caused liver dysfunction and mitochondrial energy metabolism disorder in rat. *J Inorg Biochem.* 2017;174:55-62.
218. Gomes LS, Costa JR, Campos MS, Marques MR, Biancardi MF, Taboga SR, et al. Aluminum disrupts the prenatal development of the male and female gerbil prostate (*Meriones unguiculatus*). *Exp Mol Pathol* 2019;107:32-42.
219. Martinez CS, Escobar AG, Uranga-Ocio JA, Peçanha MF, Vassallo DV, Exley C, et al. Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. *Reprod Toxicol.* 2017;73:128-141.
220. Sun X, Sun H, Yu K, Wang Z, Liu Y, Liu K, et al. Aluminum chloride causes the dysfunction of testes through inhibiting ATPase enzyme activities and gonadotropin receptor expression in rats. *Biol Trace Elem Res* 2018;183:296-304.
221. Pogue AI, Jaber V, Zhao Y, Lukiw WJ. Systemic inflammation in C57BL/6J mice receiving dietary aluminum sulfate; up-regulation of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF α , C-reactive protein (CRP) and miRNA-146a in blood serum. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2017;7(6):403.
222. Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Pérez G, Nesse A. Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2002;1558:142-50.
223. Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A. The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2005;1743:29.36.
224. Igbokwe NA. A review of the factors that influence erythrocyte osmotic fragility. *Sokoto J Vet Sci* 2018;16:1-23.
225. Oztürk B, Ozdemir S. Effects of aluminum chloride on some trace elements and erythrocyte osmotic fragility in rats. *Toxicol Ind Health* 2015;31:1069-77.
226. Cheng D, Tang J, Wang X, Zhang X, Wang S. Effect of aluminum (Al) speciation on erythrocytic antioxidant defense process: Correlations between lipid membrane peroxidation and morphological characteristics. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018;157:201-6.
227. Al-Qayim MAJ, Ghali LS, Al-Azwai TS. Comparative effects of propolis and malic acid on hematological parameters of aluminum exposed male rats. *Global J Bio-Sci Biotechnol* 2014;3:6-11.

228. Zhang Q, Cao Z, Sun X, Zuang C, Huang W, Li Y. Aluminum trichloride induces hypertension and disturbs the function of erythrocyte membrane in male rats. *Biol Trace Elem Res* 2016;171:116-23.
229. Bazzoni GB, Bollini AN, Hernández GN, Contini MC, Rasia ML. *In vivo* effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane. *J Inorg Biochem* 2005;99:822-7.
230. Sun X, Sun H, Yu K, Wang Z, Liu Y, Liu K, et al. Aluminum chloride causes the dysfunction of testes through inhibiting ATPase enzyme activities and gonadotropin receptor expression in rats. *Biol Trace Elem Res* 2018;183:296-304.
231. Fu Y, Jia FB, Wang J, Song M, Liu SM, Li YF, et al. Effects of sub-chronic aluminum chloride exposure on rat ovaries. *Life Sci* 2014;100:61-6.
232. Suwalsky M, Norris B, Villena F, Cuevas F, Sotomayor P, Zatta P. Aluminium fluoride affects the structure and functions of cell membrane. *Toxicology* 2004;42:925-33.
233. Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Pérez G, Nesse A. Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2002;1558:142-50.
234. Lukyanenko LM, Skarabahatava AS, Slobozhanina EI, Kovaliova SA, Falcioni ML. *In vitro* effect of AlCl₃ on human erythrocytes: changes in membrane morphology and functionality. *J Trace Elem Med Biol* 2013;27:160-7.
235. Skarabahatava AS, Lukyanenko LM, Slobozhanina EI, Falcioni ML, Orlando P, Silvestri S, Tiano L, Falcioni G. Plasma and mitochondrial membrane perturbation induced by aluminum in human peripheral blood lymphocytes. *J Trace Elem Med Biol* 2015;31:37-44.
236. Vota DM, Crisp RL, Nesse AB, Vittori DC. Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. *J Cell Biochem* 2012;113:1581-1589.
237. Osman HM, Shayoub ME, Babiker EM, Osman B, Elhassan AM. Effect of ethanolic leaf extract of *Moringa oleifera* on aluminum-induced anemia in white albino rats. *Jordan J Biol Sci* 2012;5:255-60.
238. Mahieu S, Contini MC, Gonzalez M, Millen N, Elias MM. Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicol Lett* 2000;111:235-42.

239. Lin CY, Hsiao WC, Huang CJ, Kao CF, Hsu GS. Heme oxygenase-1 induction by ROS-JNK pathway plays a role in aluminum-induced anemia. *J Inorg Chem* 2013;128:221-8.
240. Yokel RA. Aluminum reproductive toxicity: a summary and interpretation of scientific reports. *Crit Rev Toxicol* 2020;50:551-593.
241. Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K, Ema M, Nishikawa A. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two-generation study in rats. *Food Chem Toxicol* 2011;49:1948-59.
242. Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K, et al. Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. *Reprod Toxicol* 2011;31:219-30.
243. Kumar P, Singh P. Tribulus terrestris ameliorates aluminium chloride-induced alterations in oxidative status and functional markers in the liver, kidney, brain, and testis of the laboratory mouse. *Indian J Biochem Biophys* 2016;53:179-86.
244. Kumar P, Singh P. Protective role of Tribulus terrestris on aluminium chloride-induced reproductive toxicity in the male laboratory mouse. *Int J Pharm Sci Res* 2015;6:2395-405.
245. Zhu YZ, Sun H, Fu Y, Wang J, Song M, Li M, et al. Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats. *Life Sci* 2014;102:36-40.
246. Martinez CS, Escobar AG, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Exley C, Miguel M, Wiggers GA. Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. *Reprod Toxicol* 2017;73:128-41.
247. Klein JP, Mold M, Mery L, Cottier M, Exley C. Aluminum content of human semen: implications for semen quality. *Reprod Toxicol* 2014;50:43-8.
248. Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Powell LC. Seminal plasma trace metal levels in industrial workers. *BTER* 2000;74:97-105.
249. Hovatta O, Venalainen E-R, Kuusimäki L, Heikkilä J, Hirvi T, Reima I. Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum Reprod* 1998;13:115-9.
250. Klein JP, Mold M, Mery L, Cottier M, Exley C. Aluminum content of human semen: implications for semen quality. *Reprod Toxicol* 2014;50:43-8.

251. Sun H, Hu C, Jia L, Zhu Y, Zhao H, Shao B, et al. Effects of aluminum exposure on serum sex hormones and androgen receptor expression in male rats. *Biol Trace Elem Res.* 2011;144:1050-8.
252. Muselin F, Cristina RT, Igna V, Dumitrescu E, Brezovan D, Trif A. The consequences of aluminium intake on reproductive function in male rats: a three-generation study. *Turk J Med Sci* 2016;46:1240-8.
253. Shahraki MR, Mony EYP, Asl SZ, Sarkaki AR, Shahraki AR. Effects of aluminum chloride injection in lateral ventricle on serum gonadotropines, testosterone and spermatogenesis in rats. *J Med Sci* 2008;8:410-4.
254. Miska-Schramm A, Kapusta J, Kruczek M. The effect of aluminum exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodes glareolus*). *Biol Trace Elem Res* 2017;177:97-106.
255. Reza SM, Palan MJ. Effect of aluminum on testosterone hormones in male rat. *J Med Sci* 2006;6:296-9.
256. Khattab FKI. Histological and ultrastructural studies on the testis of rat after treatment with aluminum chloride. *Aust J Basic Appl Sci* 2007;1:63-72.
257. Mouro VGS, Menezes TP, Lima GDA, Domingues RR, Souza ACF, Oliveira JA, et al. How bad is aluminum exposure to reproductive parameters in rats? *Biol Trace Elem Res* 2018;183:314-24.
258. Kumar P, Singh P. *Tribulus terrestris* ameliorates aluminium chloride-induced alterations in oxidative status and functional markers in the liver, kidney, brain, and testis of the laboratory mouse. *Indian J Biochem Biophys* 2016;53:179-86.
259. Zhu YZ, Sun H, Fu Y, Wang J, Song M, Li M, et al. Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats. *Life Sci* 2014;102:36-40.
260. Kutlubay R, Orguz EO, Can B, Geuven MC, Sinik Z, Tuncay OL. Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. *Int J Toxicol* 2007;26:297-306.
261. Yang X, Yu K, Wang H, Zhang H, Bai C, Song M, et al. Bone impairment caused $AlCl_3$ is associated with activation of JNK apoptotic pathway mediated by oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2018;116:307-14.
262. Yu H, Zhang J, Ji Q, Yu K, Wang P, Song M et al. Melatonin alleviates aluminium chloride-induced immunotoxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis

- associated with the activation of Nrf2 signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019;173:131-41.
263. Xu F, Liu Y, Zhao H, Yu K, Song M, Zhu Y, Li Y. Aluminum chloride caused liver dysfunction and mitochondrial energy metabolism disorder in rat. *J Inorg Biochem* 2017;174:55-62.
264. Xu F, Ren L, Song M, Shao B, Han Y, Cao Z, Li Y. Fas- and mitochondria-mediated signaling pathway involved in osteoblast apoptosis induced by AlCl₃. *Biol Trace Elem Res* 2018;184:173-85.
265. Cao Z, Liu D, Zhang Q, Sun X, Li Y. Aluminum chloride induces osteoblasts apoptosis via disrupting calcium homeostasis and activating Ca(2+)/CaMKII signal pathway. *Biol Trace Elem Res* 2016;169:247-53.
266. Feibo Xu, Limin Ren, Miao Song, Bing Shao, Yanfei Han, Zheng Cao, Yanfei Li. Fas- and Mitochondria-Mediated Signaling Pathway Involved in Osteoblast Apoptosis Induced by AlCl₃. *Biol Trace Elem Res* 2018; 184:173-85.
267. Li X, Han Y, Guan Y, Zhang L, Bai C, Li Y. Aluminum induces osteoblast apoptosis through the oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. *Biol Trace Elem Res* 2012;150:502-8.
268. Prakash D, Sudhandiran G. Dietary flavonoid fisetin regulates aluminium chloride-induced neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of mice brain. *J Nutr Biochem* 2015;26:1527-39.
269. Zhu Y, Xu F, Yan X, Miao L, Li H, Hu C, Wang Z, Lian S, Feng Z, Li Y. The suppressive effects of aluminum chloride on the osteoblasts function. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;48:125-9.
270. Sun X, Liu J, Zhuang C, Yang X, Han Y, Shao B, Song M, Li Y, Zhu Y. Aluminum trichloride induces bone impairment through TGF-beta1/Smad signaling pathway. *Toxicology* 2016;371:49-57.
271. Tang CH, Chiu YC, Huang CF, Chen YW, Chen PC. Arsenic induces cell apoptosis in cultured osteoblasts through endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;241:173-81.
272. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996; 86:147-157.
273. Aly HA. Aroclor 1254 induced oxidative stress and mitochondria mediated apoptosis in adult rat sperm in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:274-83.

274. Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, et al . Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life Sci* 2013;93:367-72.
275. Ghribi O, Herman MM, Forbes MS, DeWitt DA, Savory J. GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl-XL and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neurobiol Dis* 2001;8:764-73.
276. Liang M, Russell G, Hulley PA. Bim, Bak and Bax regulate osteoblast survival. *J Bone Miner Res* 2008;23:610-20.
277. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98:2603-14.
278. Li X, Han Y, Guan Y, Zhang L, Bai C, Li Y. Aluminum induces osteoblast apoptosis through the oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. *Biol Trace Elem Res.* 2012;150:502-8.
279. Hellebrand EE, Varbiro G. Development of mitochondrial permeability transition inhibitory agents: a novel drug target. *Drug Discov Ther* 2010;4:54-61.
280. Cao Z, Liu D, Zhang Q, Sun X, Li Y. Aluminum chloride induces osteoblasts apoptosis via disrupting calcium homeostasis and activating Ca(2+)/CaMKII signal pathway. *Biol Trace Elem Res* 2018;169:247-53.
281. Mailloux RJ, Lemire J, Appanna VD. Hepatic response to aluminum toxicity: dyslipidemia and liver diseases. *Exp Cell Res.*2011;317:2231-8.
282. Nikolov IG, Joki N, Vicca S, Patey N, Auchere D, Benchitrit J. Tissue accumulation of lanthanum as compared to aluminum in rats with chronic renal failure: possible harmful effects after long-term exposure. *Nephron Exp Nephrol* 2010;115:112-21.
283. Belaïd-Nouira Y, Bakhta H, Haouas Z, Flehi-Slim I, Cheikh HB. Fenu-greek seeds reduce aluminum toxicity associated with renal failure in rats. *Nutr Res Pract* 2013;7:466-74.
284. Mailloux RJ, Appanna VD. Aluminum toxicity triggers the nuclear translocation of HIF-1alpha and promotes anaerobiosis in hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 2007;21:16-24.
285. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J* 2009;417:1-13.
286. Exley C, Price NC, Birchall JD. Aluminum inhibition of hexokinase activity in vitro: a study in biological availability. *J Inorg Biochem* 1994;54:297-304.

287. Han S, Lemire J, Appanna VP, Auger C, Castonguay Z, Appanna VD. How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: the metabolic tale. *Cell Biol Toxicol* 2013;29:75-84..
288. Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome C release occurs via Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 2001;276:19066-71.
289. Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1994;91:6569-73.
290. Cheng G, Shan J, Xu G, Huang J, Ma J, Ying S, et al. Apoptosis induced by simvastatin in rat vascular smooth muscle cell through Ca^{2+} -calpain and caspase-3 dependent pathway. *Pharmacol Res* 2003;48:571-8.
291. Chua BT, Guo K, P Li. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* 2000;275:5131-5.
292. Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 2002;38:713-21.
293. Liu Y, Templeton DM. Cadmium activates CaMK-II and initiates CaMK-II-dependent apoptosis in mesangial cells. *FEBS Lett* 2001;581:1481-6.
294. Kawano T, Kadono T, Furuichi T, Muto S, Lapeyric F. Aluminium-induced distortion of calcium signaling involving oxidative burst and channel regulation in tobacco BY-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:35-42.
295. Krakstad C, Herfindal L, Gjertsen BT, Boe R, Vintermyr OK, Fladmark KE, et al. CaM-kinase II-dependent commitment to microcystin induced apoptosis is coupled to cell budding, but not to shrinkage or chromatin hypercondensation. *Cell Death Differ* 2006;13:1191-1202.
296. Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, Peluso JJ. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase C delta-dependent pathway. *Endocrinology*. 2006; 141: 4209-4217.

Lista slika

- Slika 1.** Faktori koji dovode do akumulacije aluminijuma i nastanka toksikoze
- Slika 2.** Toksično delovanje nanočestica aluminijuma na centralni nervni system
- Slika 3.** Patogenetski mehanizam štetnog delovanja aluminijuma na muški reproduktivni sistem
- Slika 4.** Diferencijalno dekodiranje Ca^{2+} vezanih stimulusa izaziva aktivaciju ćelijskog metabolizma ili apoptozu
- Slika 5.** Morfološke promene u tkivu jetre. Regularna morfologija lobulusa jetre (K i V); degenerativne promene u hepatocitima umerenog stepena i zapaljenski infiltrat oko vene centralis (E1); koagulaciona nekroza sa piknozom jedara, degeneracija hepatocita i prošireni sinusoidi (E2); degeneracija i nekroza slabog stepena i masna promena u pojedinim hepatocitima (E3); degeneracija, nekroza i dilatacija sinusoida umerenog stepena (E4) (H&E x 600).
- Slika 6.** Depoziti aluminijuma perisinusoidalne lokalizacije u centru se prezentuje kao jedan intracelularni depozit sa jedrom komprimovanog izgleda i dva manja depozita desno. Hepatociti pokazuju izrazite degenerativne promene (Grupa E2) (H&E x 800).
- Slika 7.** Inkluzije unutar pojedinačnih ili manjih grupa hepatocita (Grupa E2)(H&Ex 400)
- Slika 8.** Snažna zapaljenska reakcija na aluminijumske depozite unutar vezivnog tkiva Kirnanovog prostora (Grupa E2) (H&E x 400).
- Slika 9.** Imunohistohemijska ekspresija Bax u tkivu jetre. Negativan nalaz (K i V); umerena imunoreaktivnost (E1); snažno citoplazmatsko prebojavanje u većem broju hepatocita (E2); redukcija citoplazmatske ekspresije (E3 i E4) (x 600).
- Slika 10.** Imunohistohemijska ekspresija Bid u tkivu jetre. Negativan nalaz (K i V); umerena imunoreaktivnost (E1); snažno citoplazmatsko prebojavanje (E2); redukcija citoplazmatske ekspresije (E3 i E4) (x 600).
- Slika 11.** Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u tkivu jetre. Normalna ekspresija Bcl-2 (K i V); slaba (E1); negativan nalaz (E2); slaba imunoreaktivnos (E3 i E4) (x 600).

- Slika 12.** Morfološke promene u tkivu testisa. E1 (10mg) i E2 (20mg) degeneracija i dezorganizacija germinativnog epitela, redukcija spermatogeneze i edem intersticijuma koji je izražen u E2; E3 (V+10mg) i E4 (V+20mg) redukcija oštećenja germinativnog epitela i smanjene intersticijalnog prostora; V (Verapamil) i K (kontrola) pokazuju regularnu morfologiju testisa (H&E x 200).
- Slika 13.** Imunohistohemijska ekspresija Bid u tkivu testisa: Slaba imunoreaktivnost je prisutna u premejotičkim ćelijama germinativnog epitela grupe E2 (20mg) (x 200).
- Slika 14.** Imunohistohemijska ekspresija Bax u tkivu testisa: Slaba do umerena imunoreaktivnost je prisutna u premejotičkim ćelijama germinativnog epitela grupe E1 i E2 kao i u grupi E4 koja je imala pretretman sa verapamilom (x 200).
- Slika 15.** Imunohistohemijska ekspresija Bcl-2 u tkivu testisa: Slaba imunoreaktivnost prisutna je u citoplazmi Leydig-ovih ćelija svih ispitivanih grupa (x 200).

Lista tabela

- Tabela 1.** Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 2.** Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 3.** Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 4.** Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 5.** Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 6.** Hematološki parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 7.** Biohemijski parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 8.** Biohemijski parametri tretiranih mužjaka Sprague-Dawley pacova
- Tabela 9.** Tkivne akumulacije aluminijuma nakon hronične administracije AlCl₃ kod Sprague-Dawley pacova
- Tabela 10.** Rezultati (prosečna vrednost±SD, n=3) dobijeni za RF snagu i protok gasa kroz nebulizator u aksijalno/radijalnom režimu
- Tabela 11.** Analitička linija izabrana u slopecal/slopecam odnosu i efekat matrice (ME), kao i linearni opseg, LOD, LOQ i koeficijent korelacije (r) kalibracione krive za determinisanje koncentracije aluminijuma
- Tabela 12.** Koncentracija aluminijuma*(µg/g) u tkivu jetre, bubrega i testisa kod pacova nakon 8 nedelja intraperitoneumske administracije AlCl₃ i “recovery” test (%)
- Tabela 13.** Patohistološke promene u jetri
- Tabela 14.** Imunohistohemijska ekspresija apoptotskih proteina Bcl-2 familije u jetri
- Tabela 15.** Poređenje površinske gustine ispitivanih parametara u tkivu testisa nakon hronične administracije aluminijum hlorida i efekat nakon upotrebe verapamila
- Tabela 16.** Patohistološke promene u testisima Sprague-Dawley pacova nakon tretmana različitim dozama aluminijuma i premedikacije verapamilom
- Tabela 17.** Patohistološke promene u testisima Sprague-Dawley pacova nakon tretmana različitim dozama aluminijuma i premedikacije verapamilom
- Tabela 18.** Ekspresija proapoptotskih proteina Bax i Bid u tkivu testisa pacova
- Tabela 19.** Ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 u tkivu testisa pacova

Lista grafikona

Grafik 1. Dendrogram klaster analize tkivnih uzoraka

Grafik 2. Poređenje hronične administracije $AlCl_3$, tkivne akumulacije i nakon davanja verapamila

Grafik 3. Glavna komponentna analiza tkiva u zavisnosti od količine akumuliranog aluminijuma

Grafik 4. Komponenta analiza uzoraka tkiva u zavisnosti od akumuliranog aluminijuma

Lista skraćenica

- Al** – hemijski znak za aluminijum
- ALIMS** – Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije
- ALP** – alkalna fosfataza
- ALT** – alanin aminotransferaza
- ASD** – autism spectrum disorder (spektar autističnih poremećaja)
- AST** – aspartat aminotransferaza
- A β peptid** – amiloid-beta peptid
- CACNA** – Calcium Voltage Dependent Channel Subunit (podjedinica voltažno zavisnih kalcijumovih kanala)
- cAMP** – cyclic adenosine monophosphate (ciklični adenzin monofosfat)
- EFSA** – European Food Safety Authority (Evropska agencija za sigurnost hrane)
- FAA** – fenilalkilamin
- FAO** – Food and Agriculture Organization (Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija)
- FDA** – Food and Drug Administration (američka Agencija za hranu i lekove)
- FEV1** – forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi
- FVC** – forsiran vitalni kapacitet
- GSH** – glutation sintaza
- GSSG** – glutationdisulfid reduktaze
- HOBP** – hronična opstruktivna bolest pluća
- HVA** – high voltage-activated (koji se aktiviraju pri većim potencijalima)
- IUPAC** – International Union of Pure and Applied Chemistry (Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju)
- JEFCA** – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Zajednički FAO / WHO ekspertski komitet za aditive hrane)
- LDH** – laktat dehidrogenaza
- LOAEL** – lowest observed adverse effect level (najniži nivo sa primećenim neželjenim efektima)
- LVA** – low voltage-activated (koji se aktiviraju pri manjim potencijalima)

- MCH** – mean corpuscular hemoglobin (srednja količina hemoglobina u eritrocitu)
- MCHC** – mean corpuscular hemoglobin concentration (srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu)
- MDA** – malonodialdehid
- NMDA** – N-metil-d-asparaginske kiseline
- NOAEL** – no observed adverse effect level (nivo bez primećenih neželjenih efekata)
- PAPLs** – provisional acceptable permissible limits (privremeno prihvatljive dozvoljene granice)
- PTWI** – provisional tolerable weekly intake (privremeno podnošljiv nedeljni unos je procena količine hemijske materije koja se može unositi nedeljno tokom života bez primetnog rizika)
- SMCL** – secondary maximum contaminant level (sekundarni maksimalni nivo zagađivača)
- TIBC** – total iron binding capacity (ukupni kapacitet vezivanja gvožđa)
- UIBC** – unsaturated iron binding capacity (slobodni kapacitet vezivanja gvožđa)
- VZKK** – voltažno-zavisni kalcijumovi kanali
- WHO** – World Health Organization (Svetska zdravstvena organizacija)

Biografija autora

Novica Bojanić rođen je 14.10.1984. godine u Nišu. Osnovnu školu "Sveti Sava" i gimnaziju "Deveti maj" završio je u Nišu. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Nišu 2011. godine, sa prosečnom ocenom 9,11 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske akademske studije upisao je 2014. godine. Aktivno se služi računarom i govori engleski i nemački jezik. U zvanje istraživača pripravnika izabran je 2016. godine, a 2019. u zvanje istraživača saradnika. Novica Bojanić kao istraživač saradnik radi na p.p. poslovima u Naučno istraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu od 2017. godine. Kao istraživač saradnik bio je angažovan u izradi projekta INT-MFN br. 3 (2017-2019): „Uticaj polimorfizama gena za faktor V Leiden, faktor II, metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) i plazminogen aktivator inhibitor-1 (PAI-1) na trombotičke komplikacije trudnoće i sterilitet. Sada kao istraživač učestvuje u izradi internih projekata Medicinskog fakulteta u Nišu:

- „Uticaj genskih polimorfizama angiogenetskih i hemostatskih regulatora na endometrijalnu receptivnost“.
- „Analiza cirkulišućih biomarkera i njihov prognostički značaj u praćenju kardiovaskularnog i oštećenja mortaliteta kod pacijenata sa hroničnom srčanom slabošću“.

Član je Lekarske komore Srbije, Srpskog lekarskog društva i Balkanske medicinske unije.