

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PUŠNIK ŽAN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PUŠNIK ŽAN

**POMEN DOLOČANJA ESENCIALNIH IN TOKSIČNIH
ELEMENTOV PRI DIALIZNIH BOLNIKI**

**THE IMPORTANCE OF ESSENTIAL AND TOXIC ELEMENTS
DETERMINATION IN DIALYSIS PATIENTS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljal v Laboratoriju za analitiko encimov in elementov v sledovih, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokem. in somentorstvom asist. mag. Alenke France-Štiglic, spec. med. biokem.

Zahvala

Somentorici asist. mag. Alenki France-Štiglic in mentorju izr. prof. dr. Milanu Skitku se zahvaljujem za strokovno pomoč in vodenje med nastajanjem naloge. Zahvaljujem se zaposlenim v laboratoriju za pomoč in napotke pri delu. Posebna zahvala gre izr. prof. dr. Jerneju Pajku, dr.med. za soglasje o uporabi podatkov o preiskovancih, za literaturo in nasvete. Staršem in Maji pa se zahvaljujem za potrpežljivost in podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Milana Skitka, spec. med. biokem. in somentorstvom asist. mag. Alenke France-Štiglic, spec. med. biokem.

Žan Pušnik

Predsednica komisije: Prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Članica komisije: Doc. dr. Urša Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

VSEBINA

Povzetek	V
Abstract.....	VII
Seznam okrajšav	IX
1 Uvod	1
1.1 Ledvice.....	1
1.2 Kronična ledvična bolezen.....	1
1.3 Dializno zdravljenje	2
1.3.2 Priprava vode za dializo	5
1.4 Esencialni elementi	6
1.4.1 Baker.....	6
1.4.2 Cink	7
1.4.3 Krom.....	8
1.4.4 Mangan	9
1.4.5 Molibden.....	9
1.4.6 Selen	10
1.5 Toksični elementi.....	11
1.5.1 Aluminij.....	11
1.5.2 Arzen	11
1.5.3 Kadmij	12
1.5.4 Nikelj	12
1.5.5 Svinec	13
1.5.6 Živo srebro.....	13
1.6 Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)	14
2 Namen dela.....	16
3 Materiali in metode	17
3.1 Preiskovanci.....	17
3.2 Vzorci.....	17
3.3 Delovno okolje, instrumenti in laboratorijski pribor	17
3.4 Reagenti, standardi in kontrolni material.....	18

3.4.1	Priprava raztopin.....	18
3.4.2	Kalibracijski standardi.....	19
3.5	Merjenje analitov	20
3.6	Statistična analiza	21
4	Rezultati in razprava.....	22
4.1	Esencialni elementi	22
4.1.1	Baker.....	22
4.1.2	Cink	24
4.1.3	Krom.....	26
4.1.4	Mangan	28
4.1.5	Molibden.....	29
4.1.6	Selen	31
4.2	Toksični elementi.....	33
4.2.1	Aluminij.....	33
4.2.2	Arzen	35
4.2.3	Kadmij	37
4.2.4	Nikelj	39
4.2.5	Svinec	41
4.2.6	Živo srebro.....	43
4.3	Vpliv rezidualne diureze na koncentracije elementov	45
4.4	Vpliv trajanja dializnega zdravljenja na koncentracije elementov	47
4.5	Vpliv vrste dialize na koncentracije elementov	48
5	Sklepi	50
6	Literatura	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Stopnje kronične ledvične bolezni.....	2
Preglednica II: Maksimalne dovoljene koncentracije elementov v vodi za dializo	5
Preglednica III: Podatki o preiskovancih.....	17
Preglednica IV: Rezultati analize Cu.....	22
Preglednica V: Rezultati analize Zn	24
Preglednica VI: Rezultati analize Cr	26
Preglednica VII: Rezultati analize Mn	28
Preglednica VIII: Rezultati analize Mo	30
Preglednica IX: Rezultati analize Se	31
Preglednica X: Rezultati analize Al.....	33
Preglednica XI: Rezultati analize As.....	35
Preglednica XII: Rezultati analize Cd	37
Preglednica XIII: Rezultati analize Ni.....	40
Preglednica XIV: Rezultati analize Pb	41
Preglednica XV: Rezultati analize Hg.....	43
Preglednica XVI: Vpliv rezidualne diureze na koncentracije elementov.....	45
Preglednica XVII: Vpliv trajanja dializnega zdravljenja na koncentracije elementov	48
Preglednica XVIII: Primerjava koncentracij med hemodializo in hemodiafiltracijo.....	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema ICP-MS.....	14
Slika 2: Primerjava koncentracij Cu v plazmi	22
Slika 3: Primerjava koncentracij Zn v plazmi	25
Slika 4: Primerjava koncentracij Cr v plazmi.....	27
Slika 5: Primerjava koncentracij Mn v krvi	28
Slika 6: Primerjava koncentracij Mo v plazmi	30
Slika 7: Primerjava koncentracij Se v plazmi.....	32
Slika 8: Primerjava koncentracij Al v plazmi.....	34
Slika 9: Primerjava koncentracij As v krvi.....	36
Slika 10: Primerjava koncentracij Cd v krvi	38
Slika 11: Primerjava koncentracij Ni v plazmi.....	40
Slika 12: Primerjava koncentracij Pb v krvi.....	42
Slika 13: Primerjava koncentracij Hg v krvi	44
Slika 14: Primerjava koncentracij Cr in Ni v plazmi glede na rezidualno diurezo	46
Slika 15: Primerjava koncentracij Cd in Pb v krvi glede na rezidualno diurezo.....	46

POVZETEK

Kronična ledvična bolezen povzroča trajno okvaro ledvic, zdravljenje pa poteka z dializo. Dializa je postopek prečiščevanja krvi z odstranjevanjem neželenih snovi in dodajanjem želenih snovi skozi polprepustno membrano hemodializatorja. Hemodializa deluje po principu difuzije, hemodiafiltracija pa poleg difuzije izkorišča še ultrafiltracijo. Dializni bolniki so letno izpostavljeni od 15000 L do 20000 L dializne tekočine, kar lahko posledično vpliva na koncentracije esencialnih in toksičnih elementov.

Želeli smo preveriti, ali imajo dializni bolniki nižje koncentracije esencialnih elementov (baker, cink, krom, molibden in selen v plazmi ter mangan v krvi) in višje koncentracije toksičnih elementov (aluminij in nikelj v plazmi ter arzen, kadmij, svinec in živo srebro v krvi) kot kontrolna skupina zdravih preiskovancev. Prav tako smo želeli ugotoviti, ali je količina rezidualne diureze pri dializnih bolnikih povezana s koncentracijami elementov, ki se izločajo pretežno preko ledvic, ali je trajanje dializnega zdravljenja povezano z nižjimi koncentracijami esencialnih elementov in višjimi koncentracijami toksičnih elementov ter, če imajo dializni bolniki na hemodiafiltraciji nižje koncentracije esencialnih elementov in višje koncentracije toksičnih elementov kot bolniki na hemodializi. Vzorce smo analizirali na masnem spektrometru z induktivno sklopljeno plazmo.

Za esencialne elemente smo ugotovili, da imajo dializni bolniki v primerjavi s kontrolno skupino nižje koncentracije bakra (743,6 µg/L; 878,8 µg/L), cinka (634,7 µg/L; 769,1 µg/L) in selena (64,81 µg/L; 89,21 µg/L) ter višje koncentracije kroma (2,2 µg/L; 0,28 µg/L), molibdena (4,6 µg/L; 0,81 µg/L) in mangana (9,38 µg/L; 7,65 µg/L). Izmed toksičnih elementov imajo dializni bolniki višje koncentracije aluminija (2,83 µg/L; 1,73 µg/L), kadmija (1,27 µg/L; 0,35 µg/L), niklja (2,06 µg/L; 0,33 µg/L) in svinca (74,33 µg/L; 18,42 µg/L) ter nižje koncentracije živega srebra (0,47 µg/L; 1,27 µg/L) kot kontrolna skupina, koncentracije arzena pa se med skupinama statistično pomembno ne razlikujejo. Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki z večjo rezidualno diurezo nižje koncentracije kroma, niklja, kadmija in svinca. Trajanje dializnega zdravljenja je povezano z višjimi koncentracijami bakra in svinca ter nižjimi koncentracijami živega srebra. Bolniki na hemodiafiltraciji so imeli višje koncentracije niklja in nižje koncentracije arzena kot bolniki na hemodializi.

| Povzetek

V prihodnje bi bilo smiselno meriti koncentracije še po končani dializi ter v dializni tekočini pred in po dializi, da dobimo še bolj jasno sliko kako dializa vpliva na elemente v sledovih.

KLJUČNE BESEDE

Hemodializa, hemodiafiltracija, esencialni elementi, toksični elementi, masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo.

ABSTRACT

Chronic kidney disease causes permanent kidney damage and is treated with dialysis. Dialysis is a blood purification technique which removes unwanted molecules and adds necessary substances through a semi-permeable membrane of a haemodialyser. Haemodialysis uses diffusion as its mechanism of action, whereas haemodiafiltration uses ultrafiltration as well as diffusion. Dialysis patients are exposed to 15000 to 20000 L of dialysis fluid per year and are therefore at risk for altered concentrations of essential and toxic elements.

We wanted to see if dialysis patients have lower concentrations of essential elements (copper, zinc, chromium, molybdenum and selenium in plasma and manganese in blood) and higher concentrations of toxic elements (aluminium, nickel in plasma and arsenic, cadmium, lead and mercury in blood) compared to the control group of healthy volunteers. Additionally, we wanted to determine if the volume of residual diuresis of dialysis patients is associated with lower concentrations of elements, primarily eliminated by kidneys; if the duration of the dialysis treatment is associated with lower concentrations of essential elements and higher concentrations of toxic elements; and whether dialysis patients treated with haemodiafiltration have lower concentrations of essential elements and higher concentrations of toxic elements as opposed to patients treated with haemodialysis. Samples of plasma and blood were analysed with inductively coupled plasma mass spectrometry.

Our results regarding essential elements show that dialysis patients had decreased level of copper (743,6 µg/L; 878,8 µg/L), zinc (634,7 µg/L; 769,1 µg/L) and selenium (64,81 µg/L; 89,21 µg/L) as well as increased levels of chromium (2,2 µg/L; 0,28 µg/L), molybdenum (4,6 µg/L; 0,81 µg/L) and manganese (9,38 µg/L; 7,65 µg/L) in comparison with the control group. Compared with the control group, dialysis patients showed increased levels of aluminium (2,83 µg/L; 1,73 µg/L), cadmium (1,27 µg/L; 0,35 µg/L), nickel (2,06 µg/L; 0,33 µg/L) and lead (74,33 µg/L; 18,42 µg/L), decreased level of mercury (0,47 µg/L; 1,27 µg/L), whereas arsenic level showed no significant difference between the groups. We found decreased level of chromium, nickel, cadmium and lead in dialysis patients with greater residual diuresis. The duration of dialysis treatment was associated with higher level of copper and lead, and lower level of mercury. Haemodiafiltration patients had

increased level of nickel and decreased level of arsenic, compared with haemodialysis patients.

In the future it would be useful to determine essential and toxic element concentrations after a dialysis session, as well as in fresh and used dialysis fluids, which would give us a much clearer picture of the effect of dialysis treatment on trace element levels.

KEY WORDS

Haemodialysis, haemodiafiltration, essential elements, toxic elements, inductively coupled plasma mass spectrometry.

SEZNAM OKRAJŠAV

DMA	dimetil arzenova kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GIT	gastrointestinalni trakt
IARC	International Agency for Research on Cancer - Mednarodna agencija za raziskovanje raka
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
KLB	kronična ledvična bolezen
MMA	metil arzenova kislina
m/z	razmerje masa/naboj
oGF	ocena glomerulne filtracije
RNA	ribonukleinska kislina
SD	standardna deviacija
T₃	trijodotironin
T₄	tiroksin

1 UVOD

1.1 Ledvice

Ledvice so odgovorne za odstranjevanje neželenih snovi iz plazme, vzdrževanje homeostaze vode in elektrolitov, vzdrževanje kislinsko-baznega ravnotežja ter sintezo in razgradnjo nekaterih hormonov (1, 2, 3).

Osnovna funkcijska enota ledvice je nefron, vsaka ledvica je sestavljena iz približno enega milijona le-teh. Nefron je sestavljen iz glomerula, proksimalnega tubula, Henlejeve zanke, distalnega tubula in zbiralc. Prvi del nefrona je glomerul, ovija ga Bowmanova kapsula. V glomerul priteka kri iz aferentne arteriole, iz njega pa se izteka po eferentni arterioli. V glomerulu zaradi visokega pritiska poteka glomerulna filtracija. Vsako minuto se filtrira od 1200 do 1500 mL krvi, pri čemer nastane od 125 do 130 mL glomerulnega filtrata (1, 2). Ultrafiltrat se izteka v proksimalni tubul, čigar naloga je, da s tubulno reabsorpcijo iz glomerulnega filtrata v plazmo vrne za organizem pomembne snovi. V proksimalnem tubulu poteka še tubulna sekrecija. To je proces prehajanja snovi iz peritubulnih kapilar v tubulni lumen in proces, ko tubulne celice izločajo produkte metabolizma v tubulni lumen. Henlejeva zanka povezuje proksimalni in distalni tubul. V Henlejevi zanki se iz filtrata reabsorbirajo voda ter natrijevi in kloridni ioni. Pri tem se filtrat razredči in postane hipoosmolalen. Filtrat iz Henlejeve zanke priteče v distalni tubul. Filtrat ima že skoraj končno sestavo urina, tu potekajo le še majhne spremembe, dokler se ne dosežeta homeostaza elektrolitov in kislinsko-bazično ravnotežje. Zbiralca so zadnja postaja, kjer se lahko urin koncentrira ali redči. Po zbiralcih se urin izteka v ledvične čaše do ledvičnega meha in nato po sečevodu do sečnega mehurja (1, 3, 4).

1.2 Kronična ledvična bolezen

Po sodobni definiciji je kronična ledvična bolezen (KLB) okvara ledvične funkcije, ki traja več kot tri mesece in se kaže kot (2, 5):

- zmanjšanje glomerulne filtracije pod $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$,
- prisotnost proteinurije ali albuminurije,
- prisotnost eritrociturije, in

- značilne morfološke spremembe pri slikovnih preiskavah ali patohistološke spremembe vzorca ledvičnega tkiva, pridobljenega z biopsijo ledvic.

Razširjenost KLB v svetu vedno bolj narašča. Pomembno je pravočasno odkrivanje bolezni, da se pri bolniku upočasni njeno napredovanje. KLB je napredujoča bolezen, ki povzroča trajno ireverzibilno okvaro ledvic. Sproži jo okvara ledvic in propad nefronov zaradi katerega koli vzroka (najpogosteje diabetes, hipertenzija in glomerulonefritis). Zaradi manjšega števila delujočih nefronov se v preostalih še delujočih glomerulih poveča tlak. Glomerulna hipertenzija povzroči povečano filtriranje proteinov, ki se reabsorbirajo v tubulih in povzročijo tubulointersticijsko fibrozo. Pri tem se nefron okvari, kar dodatno zmanjša število delujočih nefronov. KLB se na tak način stalno pospešuje in napreduje (2, 5).

Glede na oceno glomerulne filtracije ob odkritju bolezni se KLB razvrsti v pet stopenj oz. stadijev, ki so prikazani v Preglednici I (2). Bolnike s končno ledvično odpovedjo lahko zdravimo le še s presaditvijo ledvice ali dializo.

Preglednica I: Stopnje kronične ledvične bolezni (2)

Stopnja	Opis	oGF [mL/min/1,73 m ²]
1.	Okvara ledvic pri normalni oGF	>90
2.	Okvara ledvic z nekoliko znižano oGF	60-89
3.	Zmerno znižana oGF	30-59
4.	Močno znižana oGF	15-29
5.	Končna ledvična odpoved	<15

1.3 Dializno zdravljenje

Dializa je postopek prečiščevanja krvi z odstranjevanjem neželenih snovi in dodajanjem želenih snovi skozi polprepustno membrano hemodializatorja. Z dializo lahko nadomeščamo izločevalno funkcijo ledvic, vzdržujemo homeostazo vode in elektrolitov ter uravnavamo kislinsko-bazično ravnotežje (5, 6).

Za oceno rezidualne ledvične funkcije pri dializnih bolnikih se lahko uporablja merjenje rezidualne diureze, to je količina izločenega urina v 24 urah. Večina bolnikov s končno ledvično odpovedjo prične zdravljenje z dializo, ko še imajo rezidualno ledvično funkcijo, torej njihove ledvice še lahko tvorijo in izločajo urin. Rezidualna ledvična funkcija je povezana z boljšim preživetjem dializnih bolnikov (6, 7, 8).

1.3.1.1 Principi dializnega zdravljenja

Izmenjava snovi med krvjo in dializno raztopino poteka po dveh mehanizmih:

- difuzija,
- ultrafiltracija.

Difuzija je nenehno in naključno gibanje vseh molekul v raztopini, pri čemer velja, da se manjše molekule gibljejo hitreje od večjih in da molekule z mesta večje koncentracije difundirajo na mesto manjše koncentracije. V določenem času bo skozi membrano difundiralo več molekul iz raztopine z višjo koncentracijo kot pa obratno, čez nekaj časa pa se bosta koncentraciji obeh raztopin izenačili. Razlika v koncentracijah snovi na obeh straneh membrane se imenuje koncentracijski gradient. Skozi membrano hemodializatorja lahko difundirajo le molekule, ki so manjše od por membrane. Velikost molekul je sorazmerna z njihovo molekulsko maso. Membrane prepuščajo molekule z molekulsko maso do 40 ali 50 kDa, vendar je hitrost difuzije preko membrane pri velikih molekulah manjša, ker se večje molekule gibljejo počasneje in tudi zaradi večjega števila trkov molekule ob stene por membrane (5, 6).

Hitrost difuzije je odvisna tudi od koncentracijskega gradienta, večji kot je koncentracijski gradient, večja bo hitrost difuzije. Pri hemodializi je koncentracijski gradient najvišji na začetku. Če bi kri in dializna raztopina tekli v isto smer oziroma bi mirovali, bi se koncentracije snovi le izenačile. Ker pa dializna tekočina teče v nasprotni smeri toka krvi, se vzdržuje največji koncentracijski gradient vzdolž celega hemodializatorja. S tem se doseže visoka hitrost difuzije ves čas trajanja hemodialize, kar omogoči večji očistek neželenih snovi (6).

Drugi način prehoda snovi skozi polprepustno membrano je ultrafiltracija. Na membrano hemodializatorja se ustvarja tlak (transmembranski tlak), ki povzroči premik molekul vode skozi membrano. Poleg vode se istočasno prenašajo tudi molekule topljencev, ki so

raztopljeni v njej, če so le-ti manjši od por membrane. Z ultrafiltracijo tako iz krvi odstranjujemo neželene raztopljene snovi in odvečno tekočino, s čimer se zmanjša presežek vode v telesu. Hitrost ultrafiltracije se lahko uravnava s spreminjanjem tlaka v kapilarah hemodializatorja, kjer teče kri, ali pa v prostoru, kjer teče dializna raztopina.

Difuzija torej pomembneje prispeva k odstranjevanju majhnih molekul, ki lahko brez težav difundirajo skozi membrano, z ultrafiltracijo pa odstranjujemo večje molekule, ki slabo difundirajo (5, 6).

1.3.1.2 Hemodializa

Hemodializa deluje po principu difuzije, izmenjava snovi med krvjo in dializno raztopino poteka v hemodializatorju. Iz arterije po cevki priteče heparinizirana kri do hemodializatorja, kjer se porazdeli po ozkih kapilarah, ki sestavljajo polprepustno membrano. Hemodializator vsebuje veliko število kapilar, zato je celotna površina membrane običajno od 1 do 2 m². Po zunanji strani kapilar v nasprotno smer kot kri teče dializna raztopina – raztopina elektrolitov, ki ima podobno sestavo kot zunajcelična tekočina. Glavni mehanizem prečiščevanja krvi je difuzija, kjer se molekule premikajo v smeri koncentracijskega gradienta. Prečiščena kri zapusti hemodializator in se po drugi cevki vrne v veno bolnika (5, 6).

1.3.1.3 Hemodiafiltracija

Hemodiafiltracija deluje po principih difuzije in ultrafiltracije. Omogoča filtriranje neželenih snovi, poleg tega pa se iz telesa učinkovito odstranjuje tudi odvečna voda. Z ultrafiltracijo se iz telesa odstranjuje toliko vode, da jo je potrebno nadomeščati, zato se del dializne raztopine infundira v kri bolnika. Infuzija lahko poteka pred vstopom krvi v hemodializator (predilucijska hemodiafiltracija) ali po izstopu iz hemodializatorja (postdilucijska hemodiafiltracija). Takšen infuzat mora biti steril, zato se najprej ultrafiltrira preko par zaporedno vezanih ultrafiltrirnih. Celotni pretok tekočine ostane enak, zato je pri večjem pretoku infuzata sorazmerno manjši pretok dializne raztopine (5, 6).

Pri predilucijski hemodiafiltraciji je pretok infuzata večji, zato je večji tudi transmembranski tlak, kar izboljša konvekcijo velikih molekul, vendar pa se kri razredči, zato se zmanjša hitrost difuzije majhnih molekul. Pri postdilucijski hemodiafiltraciji je

razmerje med konvekcijo in difuzijo optimalno, kar omogoča najboljše odstranjevanje tako majhnih kot velikih molekul (5, 9).

1.3.2 Priprava vode za dializo

Dializni bolniki so izpostavljeni več kot 300 L dializne tekočine na teden (6, 9, 10). Kri bolnikov je preko polprepustne membrane v neposrednem stiku z dializno tekočino, pri hemodiafiltraciji se celo infundira v kri. Za razliko od dializnih bolnikov so zdrave osebe izpostavljene le okrog 12 L vode na teden preko visoko specifične črevesne sluznice (10). Že nizke koncentracije kontaminantov v dializni tekočini lahko povzročijo visoke koncentracijske gradiente med dializno tekočino in krvjo, prenos kontaminanta v krvi in potencialno toksične učinke (11, 12). Zaradi tega je izredno pomembno, da je voda, ki se uporablja za pripravo dializne tekočine ustrezno prečiščena (10). Maksimalne dovoljene koncentracije elementov v sledovih v vodi za dializo, po Smernicah za hemodializo britanskega združenja nefrologov (10), so prikazane v Preglednici II.

Preglednica II: Maksimalne dovoljene koncentracije elementov v sledovih v vodi za dializo (10)

Element	Maksimalna dovoljena koncentracija (µg/L)
Aluminij	10
Arzen	5
Baker	100
Cink	100
Kadmij	1
Krom	14
Selen	90
Svinec	5
Živo srebro	0,2

Glavna sestavina dializne tekočine je vodovodna voda. Ker vodovodna voda vsebuje številne organske in anorganske snovi ter bakterije, jo je potrebno prečistiti preden lahko

pride v stik s krvjo bolnikov. Sistem čiščenja vode je sestavljen iz različnih filtrov, vodnih mehčalcev, reverzne osmoze in deionizatorjev (6, 9, 12).

Pri čiščenju vode se uporablja več vrst filtrov, ki odstranjujejo različne nečistoče. Prefiltri odstranjujejo večje nečistoče, v velikosti od 5 do 500 μm , mikrofiltri odstranjujejo nečistoče velikosti od 1 do 5 μm , submikronski filtri pa še manjše delce v velikosti od 0,45 μm do 0,1 μm . Uporabljajo se še ultrafiltri, ki odstranjujejo mikroorganizme, pirogene, koloide in submikronske delce (6, 12). Vodni mehčalci iz vode odstranjujejo ione kalcija in magnezija, ki bi se sicer lahko kopičili v sistemu čiščenja in poškodovali opremo (6, 12). Z reverzno osmozo iz vode odstranimo vse viruse, bakterije, lipopolisaharide, organske nečistoče, do 95 % enovalentnih ionov in do 99 % večvalentnih ionov. Voda se preko polprepustne membrane filtrira zaradi visokega hidrostatskega tlaka, pri čemer se odstranijo vsi delci, ki so večji od por membrane (6, 12). Deionizatorji delujejo po principu ionske izmenjave, iz vode odstranijo katione in anione ter jih zamenjajo s H^+ in $[\text{OH}]^-$, ki nato tvorita molekule vode (6, 12).

1.4 Esencialni elementi

Elemente, ki imajo v človeškem organizmu pomembne funkcije in so nujno potrebni za pravilno delovanje organizma, imenujemo esencialni elementi. Zanje je značilno, da mora biti njihova koncentracija v t.i. oknu esencialnosti oz. optimalni koncentraciji. V nasprotnem primeru pride do:

- pomanjkanja, ki povzroči poslabšanje ali izgubo biološke funkcije, ali
- previsokih koncentracij, pri čemer se izrazijo toksični učinki (13, 14).

V nadaljevanju so opisani posamezni esencialni elementi in njihove lastnosti.

1.4.1 Baker

Baker (Cu) je esencialni element, ker je kofaktor številnih pomembnih encimov. Sodeluje pri obrambi organizma pred oksidativnimi poškodbami radikalov, pri transportu in metabolizmu železa, pri nastajanju vezivnega tkiva, pri sintezi nevrotransmitorjev in pri celičnemu dihanju (14, 15).

Pomanjkanje Cu povzroči hipokromno anemijo, nevtropenijo in nevropatijo (14, 16, 17, 18). Pomanjkanje Cu povezujejo tudi s srčno-žilnimi boleznimi. Pri bolnikih s ishemično boleznijo srca so našli znižane koncentracije Cu, pri bolnikih s hipertenzijo pa

so dokazali nižjo aktivnost encima lizil oksidaze, ki katalizira premreženje kolagena in elastina (14, 15, 19). Večje tveganje za pomanjkanje Cu imajo bolniki s celiakijo, cistično fibrozo in sindromom kratkega črevesa. Pretirano uživanje prehranskih dodatkov s cinkom lahko zmanjša absorpcijo Cu (14). Prekomeren vnos Cu povzroča erozijo epitelijskega GIT z bolečino v prebavilih, hemolitično anemijo, hepatitis z zlatenico in poškodbe ledvic. Toksičnost Cu je očitna pri Wilsonovi bolezni, kjer se Cu kopiči. Značilnosti te bolezni so hepatocelularne poškodbe, spremembe razporeditve in obnašanja ter kopičenje bakra v možganih, očeh in ledvicah (14, 20).

Absorpcija Cu poteka v tankem črevesu, v manjšem obsegu tudi v želodcu. Obseg absorpcije v gastrointestinalnem traktu je odvisen od zaužite količine – pri majhnih vnosih (<1 mg/dan) je delež absorpcije 50 %, pri večjih vnosih (>5 mg/dan) pa se delež absorpcije zmanjša na 20 %. Absorpcijo zmanjšajo visok pH ter prisotnost cinka, molibdata in železa. Absorpcijo poveča prisotnost aminokislin in natrija. Absorbiran Cu se veže na albumin in α_2 -makroglobulin ter se po portalni veni prenese do jeter. V hepatocitih se vgradi v encime in proteine, ki potrebujejo Cu. Od 60 do 90 % Cu, ki ga jetra izločijo v periferno kri je vezanega na ceruloplazmin, preostanek je vezan na albumin in α_2 -makroglobulin. Ceruloplazmin je reaktant akutne faze, njegova koncentracija se zviša med okužbami in poškodbami tkiv, zato so takrat serumske koncentracije Cu zvišane. Cu se v glavnem izloča preko žolča v blato, v manjši meri se izloča z urinom. Preko žolča se izloči od 0,5 do 2 mg Cu na dan, z urinom se izloči manj kot 3 % dnevnega vnosa Cu. Pri bolnikih s holestazo ali ostalimi oblikami disfunkcije jeter obstaja tveganje za kopičenje Cu, ker ga z žolčem ne morejo izločiti (14, 15).

1.4.2 Cink

Cink (Zn) je kofaktor encimov, ki sintetizirajo DNA in RNA, sodelujejo v metabolizmu proteinov, pri glikolizi in pri metabolizmu holesterola. Zn vpliva tudi na delovanje inzulina in inzulinu podobnega rastnega faktorja. Najpomembnejši encimi, ki za delovanje potrebujejo Zn so karbonska anhidraza, alkalna fosfataza, RNA in DNA polimeraze, alkoholna dehidrogenaza in superoksid dismutaza (1, 14, 15).

Znaki in simptomi pomanjkanja Zn so različni, nespecifični ter odvisni od stopnje in trajanja pomanjkanja. Simptomi so poslabšanje imunske funkcije, diareja, spremembe kognicije, motena toleranca na glukozo, slabša kvaliteta sperme, lezije na koži, alopecija,

okvare vida in počasnejše celjenje ran (1, 14, 15, 21, 22, 23, 24). Zn je relativno netoksičen, vendar so visoki odmerki vseeno nevarni. Zastrupitev s Zn se kaže kot bolečina v želodcu, diareja, slabost, bruhanje in hiperglikemija. Visok vnos Zn zmanjša absorpcijo Cu in s tem povzroči pomanjkanje Cu, kar povzroči zmanjšano sintezo hema in anemijo (1, 14).

V telesu je od 2 do 2,5 g Zn, prisoten je v celicah vseh metabolno aktivnih tkiv in organov. Približno dve tretjini ga je v mišicah in tretjina v kosteh. Absorpcija Zn poteka v tankem črevesu, poveča se ob prisotnosti proteinov živalskega izvora in aminokislin v obroku ter ob prisotnosti kalcija in nenasičenih maščobnih kislin. Absorpcijo zmanjšujejo prisotnost železa, vnos Zn na prazen želodec in visoki vnosi Cu, zmanjšuje pa se tudi s starostjo. Absorbiran Zn se po portalni veni prenese do jeter, kjer se vgradi v encime in veže na plazemska proteina albumin in α_2 -makroglobulin. Zn se v krvi nahaja v eritrocitih (80 %), v plazmi (17 %) in v levkocitih (3 %). 80 % plazemskega Zn je vezanega na albumin, preostanek večinoma na α_2 -makroglobulinu. Skoraj ves Zn, ki se nahaja v eritrocitih, je vgrajen v encimu karbonska anhidraza. Izločanje poteka pretežno z blatom; tako se pri zdravih osebah izloči okoli 90 % Zn, preostanek se izloči z urinom (1, 14).

1.4.3 Krom

Krom (Cr) je v obliki Cr^{3+} esencialni element, saj v človeškem organizmu sodeluje v metabolizmu glukoze, maščob in holesterola. Protein kromodulin veže Cr^{3+} in poveča odziv inzulinskih receptorjev na celičnih membranah. Toksična oblika elementa je Cr^{6+} (14).

Pomanjkanje Cr se izrazi kot glukozna intoleranca, rezistentna na inzulin, izguba teže in pojav nevroloških motenj (1, 14). Vdihavanje hlapov Cr^{6+} povzroči erozijo nosnega epitelija, ob stiku Cr^{6+} s kožo pa pride do dermatitisa in kožnih razjed. Kronična izpostavljenost nižjim odmerkom Cr^{6+} povzroči poškodbe ledvic (1, 20). Cr^{6+} je genotoksičen, povzroča pretrganje vijačnice DNA, kromosomske nepravilnosti in vezavo proteinov na DNA (25). Je tudi rakotvoren, po klasifikaciji IARC je v 1. skupini (potrjeno rakotvoren pri ljudeh) (26). Zaradi izpostavljenosti Cr^{6+} sta najpogostejša rak pljuč in rak nosu (20, 26). Zvišane koncentracije Cr v serumu so pogoste pri osebah z ortopedskimi vsadki iz Cr zlitin, kar pa verjetno nima posledic za zdravje (1, 14).

Absorpcija Cr^{3+} v gastrointestinalnem traktu je nizka (do 2,5 %), večina se ga ne absorbira in se izloči z blatom. Gastrointestinalna absorpcija Cr^{6+} je višja (3,9 % - 12 %). Absorpcija Cr se nekoliko poveča ob prisotnosti askorbinske kisline, aminokislin in oksalata. Po absorpciji se Cr v krvi veže na transferin s podobno afiniteto kot železo. Nato se koncentrira v jetrih, vranici in kosteh. Kadar je transferin nasičen, se Cr veže tudi na albumin. Cr se izloča preko ledvic z urinom: od 0,2 do 0,3 $\mu\text{g}/\text{dan}$ (1, 14, 15, 27).

1.4.4 Mangan

Mangan (Mn) je kofaktor številnih encimov. Sodeluje pri nastajanju vezivnega in kostnega tkiva, pri rasti in reprodukcijskih funkcijah ter pri metabolizmu ogljikovih hidratov in lipidov. Pomanjkanje Mn se izraža kot hipoholesterolemija, dermatitis, spremembe barve las, hiperkalcemija, hiperfosfatemija, zvišana aktivnost alkalne fosfataze in motnje strjevanja krvi. Pri uravnoveženi prehrani pomanjkanja Mn še niso odkrili. Akutna zastrupitev z Mn povzroči slabost, bruhanje, glavobol, dezorientacijo, izgubo spomina in živčnost. Kronična izpostavljenost prahu in hlapom Mn ter kopičenje Mn povzročijo simptome, podobne Parkinsonovi bolezni (1, 14, 28).

Absorpcija Mn poteka v tankem črevesu, poveča se pri nizkih in zmanjša pri visokih vnosih. Obseg absorpcije je med 2 in 15 %. Železo, kalcij, magnezij, fosfat, Cu, vlaknine, oksalat in čajni tanini zmanjšajo absorpcijo Mn. Po absorpciji se po portalni veni prenese v jetra v nevezani obliki kot Mn^{2+} , vezan na albumin ali vezan na α_2 -makroglobulin. V jetrih se veže na albumin, α_2 -makroglobulin, transferin, ali pa ostane prost kot Mn^{2+} . Tak se po krvi porazdeli v tkiva po telesu. Izločanje Mn poteka preko jeter v žolč in v blato; preko ledvic se izloča v zelo majhnih količinah (1, 14, 15).

1.4.5 Molibden

Molibden (Mo) je kofaktor vsaj treh encimov: ksantin oksidaze, aldehyd oksidaze in sulfid oksidaze, ki za pravilno delovanje potrebujejo kofaktor molibdopterin (1, 14). Mo je zato, kot del molibdopterina, nujno potreben pri razgradnji aminokislin metionina in cisteina, pri metabolizmu purinov in pri metabolizmu zdravilnih učinkovin (14, 15). Simptomi pomanjkanja Mo so visoke koncentracije metionina, hipoksantina in ksantina ter nizke koncentracije sečne kisline (15). Pomanjkanja pri zdravih osebah z uravnoveženo prehrano niso opazili (14). Visoka izpostavljenost Mo lahko privede do zvišane koncentracije ceruloplazmina in sečne kisline v serumu in simptomov podobnim protinu. Prevelik vnos

Mo lahko inducira pomanjkanje Cu, saj z njim tvori netopne komplekse, ki blokirajo njegovo absorpcijo (1, 14, 29, 30).

Mo se učinkovito absorbira v želodcu in tankem črevesu. Sulfat kompetitivno inhibira absorpcijo Mo. Od 80 do 90 % Mo v krvi je vezanega na proteine v eritrocitih. Manjši del se po plazmi prenaša na α_2 -makroglobulinu. V telesu se porazdeli in zadržuje v jetrih, kosteh in ledvicah. Izločanje pretežno poteka z urinom in je sorazmerno z vnosom. Preko žolča se v blato izloča v manjši meri, okoli 10 % (1, 14).

1.4.6 Selen

Selen (Se) je esencialni element, nujno potreben za delovanje encimov glutacion peroksidaze in jodotironin dejodinaze. Glutacion peroksidaza ščiti organizem pred oksidativnimi poškodbami, jodotironin dejodinaza pa je odgovorna za pretvorbo neaktivnega ščitničnega hormona T_4 v aktivno obliko hormona T_3 . Vnos Se poteka v glavnem preko hrane in vode (1, 14).

Pomanjkanje Se lahko povzroči kardiomiopatijo, kardiogeni šok, povečanje srca, kongestivno srčno odpoved, omotico, slabo počutje, izgubo teka, slabost, mrzlico, šibkost skeletnega mišičja in osteoartritis. Opazili so tudi povezavo med pomanjkanjem Se in pojavnostjo raka debelega črevesa, danke, prostate, dojke, jajčnikov, pljuč in levkemije (1, 14, 21, 31). Simptomi zastrupitve s Se so različni in so odvisni od odmerka, oblike zaužitega Se in časa izpostavljenosti. Simptomi so izguba las, mišični krči, slabost, bruhanje, diareja, bolečina v sklepih, utrujenost, spremembe na nohtih in mehurji na koži. Akutna izpostavljenost visokim koncentracijam Se povzroči slabost, bruhanje, diarejo in tahikardijo (1, 14).

Absorpcija Se poteka v GIT, je učinkovita in ni regulirana. Anorganski soli selenit in selenat, ki se uporabljata v prehranskih dopolnilih, se skoraj popolnoma absorbirata, a se veliko selenata hitro izloči z urinom. Celotna količina Se v telesu je okoli 15 mg. Tkivne koncentracije so najvišje v ledvicah in jetrih, koncentracije v krvi in plazmi so odvisne od vnosa. V plazmi je od 50 do 60 % Se vezanega na selenoprotein P, 30 % na glutacion peroksidazo, preostanek je vezan na albumin v obliki selenometionina. Izločanje Se poteka pretežno preko ledvic, v manjši meri z blatom. Količina izločenega Se je sorazmerna z vnosom (1, 14).

1.5 Toksični elementi

1.5.1 Aluminij

Aluminij (Al) je toksična kovina, ki se v telo vnese s hrano, vodo ali zdravili, ki vsebujejo Al. Njegovo kopičenje lahko povzroči osteomalacijo in encefalopatijo (32). Kopičenje Al v možganih povezujejo z Alzheimerjevo boleznijo, vendar ni znano ali je kopičenje posledica ali vzrok bolezni (20).

Al se v GIT slabo absorbira, le od 0,1 do 0,6 %. V plazmi je 90 % Al vezanega na transferin. Distribuira se po celem telesu, najvišje koncentracije najdemo v kosteh in pljučih. Celokupna vsebnost Al v telesu pri zdravih osebah je od 30 do 50 mg. Izloča se preko ledvic s filtracijo v glomerulu, v manjši meri z žolčem. Normalen vnos (5 – 10 mg) se pri zdravih ledvicah povsem izloči in se v organizmu ne kopiči (20, 32).

1.5.2 Arzen

Arzen (As) nima poznane vloge v človeški fiziologiji, pomemben je le kot toksični element. As se pogosto nahaja v ribah in morski hrani, vendar so te oblike netoksične. As se uporablja v proizvodnji pesticidov, konzervansov, zlitin, stekla in polprevodnikov. Pri delavcih v teh industrijskih panogah lahko pride do zastrupitev (1, 20). As je akutni in kronični toksin. Pri akutni zastrupitvi lahko pride do slabosti, bruhanja, bolečin v trebuhu, diareje, pancitopenije, encefalopatije, odpovedi ledvic in hepatitisa. Kronična izpostavljenost lahko povzroči dermatološke, hepatične, kardiovaskularne in maligne spremembe (1, 33).

Glavne poti vnosa As so zaužitje hrane in pijače, ki vsebuje As, ter inhalacija z As kontaminiranega zraka. As se hitro distribuira po telesu, zato zvišane koncentracije v krvi zaznamo le kratek čas po vnosu (20). As poznamo v netoksičnih in toksičnih oblikah. Netoksične organske oblike As, arzenobetain in arzenoholin, se izločijo hitro, v 1 do 2 dneh. Med toksične anorganske oblike uvrščamo trivalentni As^{3+} in še bolj toksični pentavalentni As^{5+} . Delno detoksificirani presnovki so metil arzenova kislina (MMA) in dimetilarzenova kislina (DMA). Detoksifikacija poteka v jetrih, ko se As^{5+} reducira v As^{3+} , nato pa metilira v MMA in DMA (1, 20). As se izloča z ledvicami. Razpolovni čas anorganskega As v krvi je od 4 do 6 ur, metiliranih presnovkov pa od 20 do 30 ur (20, 33).

1.5.3 Kadmij

Kadmij (Cd) nima poznane vloge v človeški fiziologiji. Koncentracija Cd v organih narašča s starostjo. Cd najdemo v tobačnih izdelkih, njihova uporaba zviša koncentracijo Cd v krvi. Cd se kot pigment uporablja v barvah, zato se moramo zavedati možnosti kontaminacije vzorcev, če pri delu v laboratoriju uporabljamo rumeno obarvane plastične nastavke za pipete. Cd se kopiči v ledvicah in lahko poškoduje ledvično tkivo. Vdihavanje visokih koncentracij Cd povzroči poškodbe dihal. Kronična izpostavljenost Cd lahko privede tudi do bolezni kosti. Pri ljudeh, ki živijo na območjih kontaminiranih s Cd, so opazili znižano kostno gostoto, povečano tveganje za zlome in povečano tveganje za osteoporozo (1, 20, 34).

Pri nekadilcih je glavna pot vnosa Cd s hrano. Gastrointestinalna absorpcija je okoli 5 %, absorpcija inhaliranega Cd pa med 10 in 50 %. Absorpcija je višja pri ženskah in osebah s pomanjkanjem železa. V krvi se nahaja pretežno v eritrocitih, v plazmi je vezan na metalotionein in albumin. Cd v krvi odraža povprečen vnos v prejšnjih mesecih in se lahko uporablja za spremljanje izpostavljenosti Cd. Kadilci imajo v telesu dvakrat višjo vsebnost Cd kot nekadilci. Cd se kopiči v jetrih, ledvicah, mehurju, mišicah, pljučih. Izločanje poteka zelo počasi (razpolovni čas Cd v telesu je 26 let), z urinom in blatom v približno enakem obsegu (1, 34, 35).

1.5.4 Nikelj

Fiziološka vloga niklja (Ni) ni poznana. Predvidevajo, da bi lahko deloval kot kofaktor metaloenzimov in metaloproteinov ali kot kofaktor pri intestinalni absorpciji železa. Najpogostejši učinki izpostavljenosti Ni so kontaktni dermatitis, pri vdihavanju hlapov Ni pa kronični bronhitis, emfizem, pulmonarna fibroza, okrnjena funkcija pljuč in celo rak pljuč. Ni je v oksidacijskih stanjih Ni^+ , Ni^{2+} in Ni^{3+} dokazano rakotvoren pri ljudeh in spada v 1. skupino rakotvornih snovi po klasifikaciji IARC (20, 26, 36).

Delež absorpcije Ni pri inhalaciji je od 20 do 35 %, pri zaužitju pa 27 % za Ni iz vode in le 1 % za Ni iz hrane. Ni se lahko absorbira tudi preko kože, vendar ostane v njej in ne prehaja v kri. Najvišje koncentracije Ni so v koži, ščitnici, nadledvičnih žlezah in črevesju. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se kopiči tudi v pljučih. V plazmi se Ni veže na α_2 -makroglobulin, L-histidin, nikeloplazmin in s Cu tekmuje za vezavo na albumin. Ni se izloča preko ledvic z urinom (36).

1.5.5 Svinec

Svinec (Pb) je akutni in kronični toksin. Uporablja se v proizvodnji akumulatorjev, streliva in folij. V nekaterih državah se še vedno uporablja v barvah, kar je pomemben vir izpostavljenosti. Izpostavljenost Pb lahko povzroči hipertenzijo, anemijo, okvare ledvic in nevrološke motnje (1, 20, 21, 37).

Do izpostavljenosti Pb pride preko vdihavanja ali zaužitja. Učinkovitost absorpcije pri inhalaciji je od 30 do 40 %. Absorbira se od 1 do 10 % s hrano zaužitega Pb, pri otrocih celo do 50 %. Železo, kalcij, magnezij, alkohol in maščobe lahko zmanjšajo absorpcijo, povečajo pa jo nizke koncentracije Zn v hrani, askorbinska kislina in citronska kislina. Delež absorbiranega Pb se poveča pri pomanjkanju hranil. Večina zaužitega Pb se ne absorbira in se izloči z blatom. V krvi se 99% Pb nahaja v eritrocitih, kjer je vezan na proteine. Preostanek je v plazmi vezan večinoma na albumin. Razpolovni čas v krvi je 2 do 3 tedne. Iz krvi se Pb porazdeli v mehka tkiva (jetra, ledvice, možgani). Končna shramba Pb je v mehkih tkivih (od 5% do 30%) in v kosteh (od 70 do 95 %). Izločanje Pb poteka z urinom (76 %), z blatom (16%), ostalih 8% pa se izloči z lasmi, nohti in potom (1, 20, 37).

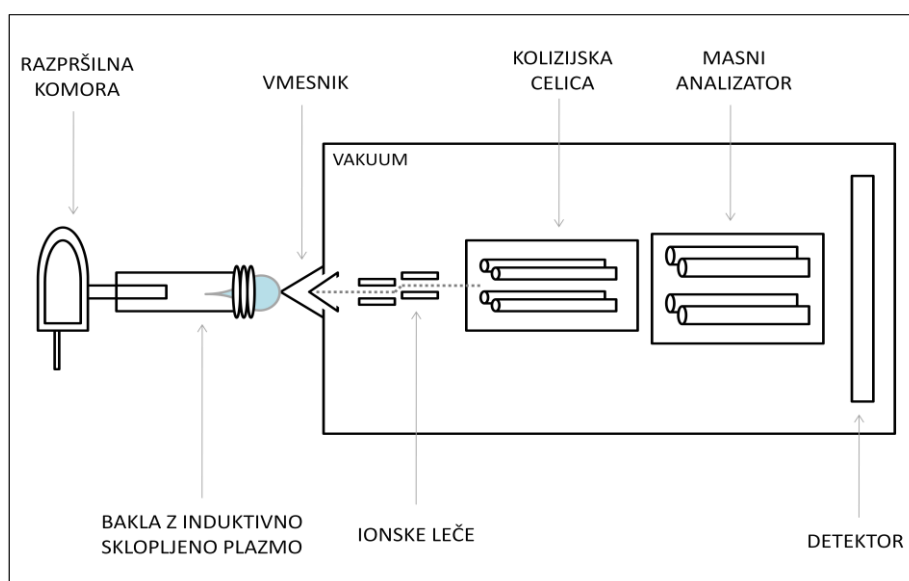
1.5.6 Živo srebro

Tudi živo srebro (Hg) je pri ljudeh pomembno le kot toksični element. Hg v elementarni obliki Hg^0 ni toksično, toksično postane šele, ko se ionizira v anorgansko obliko Hg^{2+} . Hg^{2+} se lahko pretvori v alkilne oblike Hg kot npr. metilHg CH_3Hg^+ in dimetilHg $(CH_3)_2Hg$, ki sta bolj toksični od Hg^{2+} in imata veliko afiniteto za tkiva bogata z lipidi. Organske oblike Hg se kopičijo v nevronih in so toksične za centralno in periferno živčevje. MetilHg vpliva tudi na plod, odvisno od stopnje izpostavljenosti *in utero*, so lahko posledice počasnejši razvoj ploda ali celo fetalna smrt. MetilHg se kopiči v morski prehranjevalni verigi, zato so ljudje izpostavljeni Hg večinoma preko morske hrane. Hg^{2+} se koncentrira v ledvicah med izločanjem in lahko poškoduje ledvično tkivo (1, 20, 38). Osebe z dentalnimi zalivkami so bolj izpostavljene Hg kot tiste brez zalivk, ker se Hg sprošča iz zalivk pri žvečenju ali umivanju zob. Po vstavitvi ali zamenjavi dentalnih zalivk se začasno rahlo zviša koncentracija Hg v krvi. Posledic za zdravje zaradi sproščanja Hg iz dentalnih zalivk niso odkrili (1, 20, 38). Simptomi in znaki zastrupitve so različni in nespecifični, pojavijo se lahko: glavobol, tremor, motnje koordinacije, trebušni krči, diareja, dermatitis, polinevropatija, proteinurija in disfunkcija jeter (1, 38).

Hg lahko v telo vnesemo preko vdihavanja hlapov, preko morske hrane ali transdermalno. MetilHg se hitro absorbira skozi kožo, tudi skozi lateksne rokavice. Absorpcija hlapov Hg^0 v pljučih je visoka (od 70 do 80%). V GIT se Hg^0 praktično ne absorbira in se v celoti izloči z blatom. Absorpcija organskih oblik Hg po zaužitju je skoraj popolna (20, 38). Hg se v krvi nahaja v eritrocitih in v plazmi. V eritrocitih je vezano na proteine in prosto v citoplazmi. V plazmi je večinoma vezano na albumin. Hg vseh oblik se najbolj kopiči v ledvicah, sledijo jetra, vranica in možgani (1, 38). Anorgansko Hg se izloča z urinom in blatom, elementarno pa še z izdihanim zrakom. Organske oblike Hg se izločajo predvsem z blatom. Tako anorgansko Hg kot metilHg se izločata z materinim mlekom (38).

1.6 Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)

Sestavni deli aparata ICP-MS (z izjemo avtomatskega vzorčevalnika in računalnika s programsko opremo Masshunter) so shematsko prikazani na Sliki 1.



Slika 1: Shema ICP-MS

Peristaltična črpalka posrka vzorec iz vial in ga po cevki pošlje do razpršilca, ki vzorec razprši v razpršilno komoro. Razpršilna komora je oblikovana tako, da večje kapljice zadenejo ob stene komore in stečejo v odpad. Le najmanjše kapljice v obliki aerosola zapustijo razpršilno komoro. Nosilni plin argon jih po stekleni cevi odnese naprej proti bakli - to je cev iz kvarca, ovita s tuljavo, skozi katero teče radio frekvenčni tok s frekvenco 27 MHz. Tuljava v bakli inducira elektromagnetno polje, kar ionizira argon. Pri

tem nastane argonova plazma, ki ima v središču temperaturo od 8000 K do 10000 K. Aerosol vzorca v plazmi najprej izhlapi, molekule razpadejo na atome, atomi izgubijo elektron iz zunanje orbitale, pri tem pa nastanejo pozitivno nabiti ioni (39, 40, 41).

Preko vmesnika, ki je sestavljen iz dveh zaporednih stožcev z majhnima odprtinama tok ionov potuje v vakuumski del aparata. Tok ionov je na tem mestu sestavljen iz pozitivno nabitih ionov, nevtralnih atomov in elektronov. Ionske leče, ki so naslednji del aparata, pospešijo pozitivno nabite ione in odbijajo elektrone. Prav tako fokusirajo tok ionov in spremenijo smer pozitivno nabitih ionov, ki nadaljujejo pot v kolizijsko celico. Smer nevtralnih atomov in fotonov se ne spremeni, zato trčijo v leče. S tem jim preprečimo vstop v masni analizator in detektor, kjer bi lahko povzročali interference in zvišali signal ozadja. Interference se odstranjujejo tudi v naslednjem delu, kolizijski celici. Atomi helija trkajo ob ione in jim s tem zmanjšujejo kinetično energijo. Poliatomski ioni, ki predstavljajo interference so večji in večkrat trčijo ob atome helija, zato izgubijo več energije in ne dosežejo masnega analizatorja (39, 40, 41).

Masni analizator je kvadrupol, sestavljen iz štirih kovinskih palic, ki so pod napetostjo. Pri določeni napetosti deluje kot filter in prepušča le ione z določenim razmerjem masa/naboj (m/z), vsi ostali ioni zadenejo ob palice. Ioni s pravilnim razmerjem m/z dosežejo detektor, ki izmeri število signalov. Detektor je elektronska pomnoževalka, sestavljen je iz več dinod. Ko ion zadene prvo dinodo, ta odda več elektronov, ki zadenejo naslednjo dinodo in cikel se nekajkrat ponovi. S tem se signal pomnoži tudi do 10^6 -krat. Kolektor zazna celoten pulz elektronov, kar predstavlja en signal (39, 40, 41).

2 NAMEN DELA

Zaradi prenosa elementov preko membrane hemodializatorja lahko pri dializnih bolnikih pride do pomanjkanja esencialnih elementov ali do zastrupitev s toksičnimi elementi. Dializni bolnik je v enem letu izpostavljen od 15000 L do 20000 L dializne tekočine (6). Zaradi izpostavljenosti tako velikim količinam dializne tekočine, lahko pride pri bolnikih do spremenjenih koncentracij elementov.

Preverili bomo naslednje hipoteze:

1. Koncentracije esencialnih elementov Cu, Zn, Cr, Mo in Se v plazmi in Mn v krvi so nižje pri dializnih bolnikih kot pri kontrolni skupini.
2. Koncentracije toksičnih elementov Al in Ni v plazmi in As, Cd, Pb in Hg v krvi so višje pri dializnih bolnikih kot pri kontrolni skupini.
3. Rezidualna diureza pri dializnih bolnikih obratno sorazmerno vpliva na koncentracije elementov, ki se izločajo pretežno preko ledvic. Pri dializnih bolnikih z večjo rezidualno diurezo pričakujemo nižje plazemske oz. krvne koncentracije elementov.
4. Trajanje dializnega zdravljenja je povezano z nižjimi koncentracijami esencialnih elementov in višjimi koncentracijami toksičnih elementov.
5. Bolniki na hemodiafiltraciji so izpostavljeni še večjim količinam dializne tekočine kot pri običajni hemodializi, zato so pri njih koncentracije esencialnih elementov še nižje in koncentracije toksičnih elementov še višje kot pri bolnikih na hemodializi.

Dodatno bomo :

1. Primerjali izmerjene koncentracije esencialnih in toksičnih elementov z orientacijskimi referenčnimi vrednostmi Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana.
2. V literaturi poiskali možne vzroke za spremenjene koncentracije elementov pri dializnih bolnikih in ali so spremenjene koncentracije klinično pomembne.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovanci

Podatki o preiskovancih so zbrani v Preglednici III.

Preglednica III: Podatki o preiskovancih

Skupina	Število preiskovancev	Število moških	Število žensk	Povprečna starost (razpon)
Kontrolna skupina	108	42	66	54,95 (23 - 88)
Dializni bolniki	80	53	27	55,4 (22 - 88)

S t-testom smo preverili ali sta se skupini razlikovali glede na starost. Skupini se glede na starost nista statistično pomembno razlikovali ($t(186) = 0,189$, $p = 0,851$). S χ^2 testom smo preverili homogenost skupin po spolu. Skupina dializnih bolnikov in kontrolna skupina sta se po spolu razlikovali ($\chi^2 = 13,8$, $p < 0,0005$).

Podatki o preiskovancih in vzorci so bili pridobljeni iz raziskave Ocena gibalne oviranosti dializnih bolnikov, ki jo vodi izr. prof. dr. Jernej Pajek, dr.med.

3.2 Vzorci

Vzorci dializnih bolnikov so bili odvzeti v dializnih centrih neposredno pred dializo. Kri je bila odvzeta v epruvete za analizo elementov v sledovih s K_2EDTA (Trace element analysis Vacutainer, Becton Dickinson). V roku dveh ur po odvzemu smo kri razdelili na dva dela, en del smo ohranili kot polno kri, drug del pa centrifugirali 5 min pri 3000 obratih/min in ločili plazmo od celic. Vzorce polne krvi in plazme smo do analize zamrznili in hranili pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 Delovno okolje, instrumenti in laboratorijski pribor

Vzorci smo analizirali na masnem spektrometru Agilent 7700x ICP-MS. Uporabljali smo avtomatske pipete s plastičnimi nastavki za enkratno uporabo in plastične epruvete, v katerih smo pripravljali vzorce za analizo. Celoten postopek je potekal v čisti sobi s filtriranim zrakom. Vzorce smo centrifugirali v centrifugi Hettich Rotanta 460R.

3.4 Reagenti, standardi in kontrolni material

Za določanje elementov smo uporabljali naslednje reagente:

- HNO₃ (65 % Suprapur quality, Merck, Nemčija),
- HCl (30 % Suprapur quality, Merck, Nemčija),
- EDTA (99,995 %, trace metals basis, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- Triton X-100 (Suprapur quality, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 1-butanol (ACS reagent $\geq 99,4$ %, Sigma-Aldrich, Nemčija),
- raztopina amonijevega hidroksida (25 % NH₃ v H₂O, Suprapur, Merck, Nemčija),
- ICP-MS Tuning Solution (Agilent, ZDA),
- ICP-MS Internal Standard (Agilent, ZDA),
- sterilna voda (B. Braun, Nemčija),
- kalibrator ICP-MS Calibration Standard 57 (Inorganic Ventures, ZDA),
- kalibrator ICP-MS Calibration Standard 27 (Inorganic Ventures, ZDA),
- kalibrator ICP-MS Calibration Standard Gold (Inorganic Ventures, ZDA),
- kalibrator Hg Calibration Standard (Merck, Nemčija),
- nosilni plin argon (99,99 % čist Linde, Nemčija),
- kolizijski plin helij (99,99 % čist Linde, Nemčija).

Za plazemske vzorce smo uporabljali kontrolni material

- Seronorm Trace Elements serum L-1 (SERO, Norveška).

Za vzorce krvi smo uporabljali kontrolni material

- Seronorm Trace Elements whole blood L-1 (SERO, Norveška),
- Seronorm Trace Elements whole blood L-2 (SERO, Norveška).

3.4.1 Priprava raztopin

Osnovna amonijevega raztopina:

V 500 mL vode smo dodali 13,5 mL butanola, 0,435 mL Tritona X-100, 7,65 mL raztopine amonijevega hidroksida, 0,420 g EDTA, dopolnili z vodo do 750 mL in dobro premešali.

Amonijeve raztopine z internim standardom:

V 350 mL osnovne amonijeve raztopine smo dodali 170 μ L raztopine ICP-MS Internal Standard.

Raztopina za umerjanje aparata:

V 50 mL 2% HNO_3 smo dodali 5 μ L raztopine ICP-MS Tuning Solution.

Raztopina kislin za spiranje ICP-MS:

20 mL 65% HNO_3 in 10 mL 30% HCl smo dodali v 500 mL vode. Z vodo smo nato dopolnili do 1000 mL.

3.4.2 Kalibracijski standardi

Najprej smo pripravili delovno raztopino kalibratorja Hg. 100 μ L osnovnega standarda Hg smo dodali 9,9 mL osnovne amonijeve raztopine.

V dve epruveti smo pripravili osnovni raztopini S1 in S2.

Osnovna raztopina S1:

- 1 mL kalibratorja ICP-MS Calibration Standard 57,
- 1 mL kalibratorja ICP-MS Calibration Standard 27,
- 1 mL kalibratorja ICP-MS Calibration Standard Gold,
- 1 mL delovne raztopine kalibratorja Hg,
- 6 mL osnovne amonijeve raztopine.

Osnovna raztopina S2:

- 1 mL kalibratorja ICP-MS Calibration Standard 57,
- 1 mL kalibratorja ICP-MS Calibration Standard 27,
- 8 mL osnovne amonijeve raztopine.

Iz osnovnih raztopin smo pripravili kalibracijske raztopine:

- Standard 1000 $\mu\text{g/L}$: Raztopina S2
- Standard 500 $\mu\text{g/L}$: 3 mL S2 + 3 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 250 $\mu\text{g/L}$: 2 mL S2 + 6 mL osnovne amonijeve raztopine

- Standard 100 µg/L: 1 mL S1 + 9 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 50 µg/L: 0,5 mL S1 + 9,5 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 10 µg/L: 0,1 mL S1 + 9,9 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 5 µg/L: 0,5 mL standarda 100 µg/L + 9,5 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 1 µg/L: 0,1 mL standarda 100 µg/L + 9,9 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 0,5 µg/L: 1 mL standarda 1 µg/L + 1 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 0,25 µg/L: 1 mL standarda 0,5 µg/L + 1 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 0,125 µg/L: 1 mL standarda 0,25 µg/L + 1 mL osnovne amonijeve raztopine
- Standard 0 µg/L – slepi vzorec: 10 mL osnovne amonijeve raztopine

3.5 Merjenje analitov

Na začetku vsake serije smo naredili umeritveno premico. Zato smo iz kalibracijskih raztopin pripravili delovne kalibracijske standarde. V epruvete smo odpipetirali 200 µL posamezne kalibracijske raztopine, dodali 2 mL amonijeve raztopine z internim standardom in na mešalniku premešali. Tako pripravljene kalibracijske standarde smo prelili v vialo in vstavili na ustrezno mesto v avtomatski vzorčevalnik. Po analizi kalibracijskih standardov smo s programsko opremo Masshunter izračunali in izrisali umeritveno premico.

Zamrznjene vzorce plazme in krvi smo odtalili na sobni temperaturi in na vibracijskem mešalniku premešali. V epruveto smo odpipetirali 200 µL vzorca, dodali 2 mL amonijeve raztopine z internim standardom in na vibracijskem mešalniku premešali. Tako pripravljene vzorce smo prelili v vialo in vstavili na ustrezno mesto v avtomatski vzorčevalnik.

Zanesljivost meritev smo preverjali z analizo kontrolnega materiala Seronorm Trace Elements. 200 µL kontrolnega materiala smo pripravili na enak način kot vzorce in kalibracijske standarde. Kontrolni material smo prvič analizirali pred začetkom meritev. Če so bile vrednosti kontrolnega materiala v dovoljenem intervalu smo nadaljevali z

analiziranjem vzorcev. Kontrolni material smo ponovno analizirali vsakih 15 vzorcev, in še enkrat na koncu serije.

3.6 Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili programe Microsoft Office Excel in IBM SPSS. Koncentracije elementov smo obdelali z opisno statistiko in s testom Shapiro-Wilk preverili normalnost porazdelitve. S testom Mann-Whitney U smo preverili ali se koncentracije elementov, ki se ne porazdeljujejo normalno, razlikujejo med skupinama. Pri elementih, ki se porazdeljujejo normalno smo naredili t-test za dva neodvisna vzorca. Homogenost skupin po spolu smo preverili s testom χ^2 . Homogenost skupin po starosti smo preverili s t- testom. S testom ANOVA smo preverili ali rezidualna diureza in trajanje dializnega zdravljenja vplivata na koncentracije elementov pri dializnih bolnikih.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

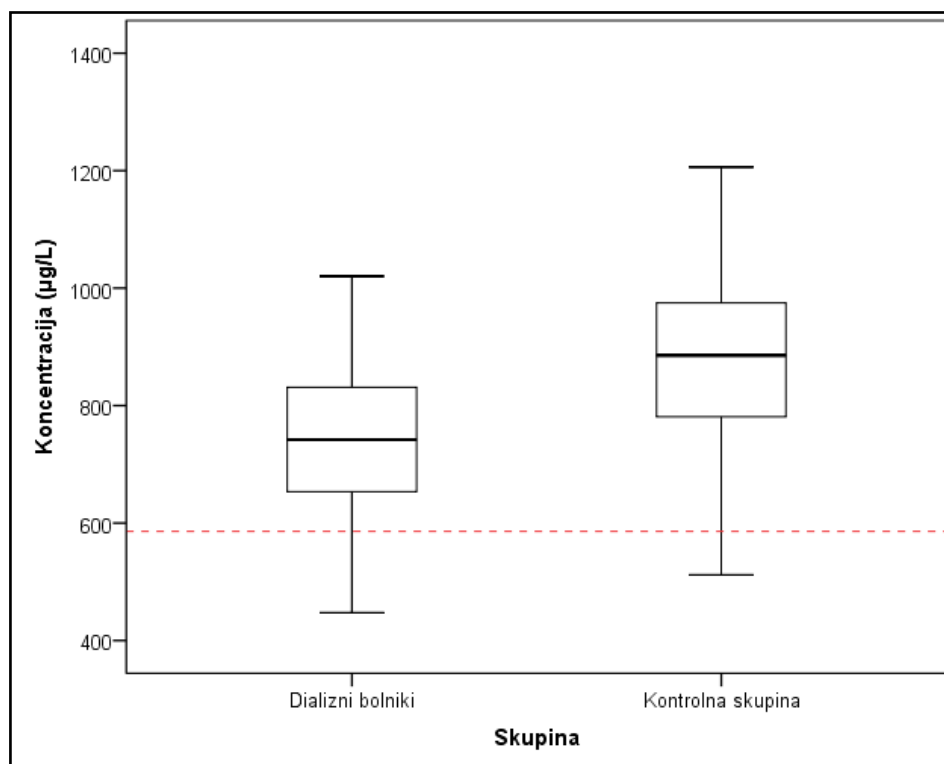
4.1 Esencialni elementi

4.1.1 Baker

Rezultati analize Cu v plazmi so zbrani v Preglednici IV in grafično prikazani na Sliki 2. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni normalno.

Preglednica IV: Rezultati analize Cu

		Število preiskovancev	Aritmetična sredina ($\mu\text{g/L}$)	Razpon koncentracij ($\mu\text{g/L}$)
Plazma	Dializni bolniki	80	743,6	447,3 - 1020,1
	Kontrolna skupina	106	878,8	511,7 - 1206,2



Slika 2: Primerjava koncentracij Cu v plazmi. Rdeča črta je spodnja referenčna meja za Cu v plazmi (586 $\mu\text{g/L}$)

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v plazmi in v krvi statistično pomembno nižje koncentracije Cu kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). Podatki o koncentracijah Cu pri

dializnih bolnikov se v literaturi razlikujejo. Van Renterghem in sodelavci so ugotovili, da so koncentracije Cu pri dializnih bolnikih višje (42). Enako so ugotovili tudi Tonelli in sodelavci v meta-analizi 128 raziskav (21). V dveh raziskavah so ugotovili da se serumske koncentracije Cu pri dializnih bolnikih ne razlikujejo od kontrolne skupine (43, 44). V novejši raziskavi, kjer so vzorce analizirali na enakem aparatu kot mi, pa so tako kot mi ugotovili, da so koncentracije Cu pri dializnih bolnikih nižje (45). 7 od 80 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Cu pod referenčno mejo 586 $\mu\text{g/L}$, kar predstavlja 8,8% bolnikov. 3 od 106 kontrolnih preiskovancev so imeli koncentracijo pod referenčno mejo, kar je 2,8%.

Možni vzroki za nižje koncentracije Cu pri dializnih bolnikih so izguba z dializo, zmanjšana absorpcija, nezadosten vnos, spremenjena distribucija med organi ali spremembe volumna plazme (45, 46, 47). Po krvi se Cu prenaša na ceruloplazminu, transportnem proteinu z molekulsko maso okoli 132 kDa, kar presega velikosti por membrane hemodializatorjev (6, 48). Zato domnevamo, da izgube z dializo niso verjeten razlog za zmanjšane koncentracije Cu. To domnevo potrjujejo tudi raziskave, kjer so določali koncentracije Cu pred in po dializi in ugotovili, da se je koncentracija Cu po dializi nekoliko zvišala (31, 45). Višje koncentracije v plazmi po dializi bi lahko bile posledica koncentriranja krvi zaradi dialize. Med dializo bolniki namreč izgubijo v povprečju okoli 10 % volumna plazme (47). S tem ko se zmanjša volumen plazme, se poveča koncentracija prenašalnih proteinov in posledično Cu. To potrjuje tudi ugotovitev, da je koncentracija plazemskih proteinov po končani dializi višja kot pred dializo (47). V naši raziskavi so bili vzorci odvzeti tik pred dializo. Znano je, da pri dializnih bolnikih velik problem predstavlja hipervolemija. Zaradi nedelujočih ledvic se ne izloča natrij, kar v telesu zadržuje vodo, in prispeva k hipervolemiji (49). Podatkov o volumnu plazme bolnikov v naši raziskavi sicer nimamo, ampak če bi imeli bolniki povečane volumne, bi to razredčilo plazmo, koncentracija plazemskih proteinov bi bila nižja, s tem pa tudi koncentracija Cu, ki je vezan na ceruloplazmin. Dodaten razlog za nižje koncentracije Cu pri dializnih bolnikih bi lahko bil zmanjšan vnos Cu. V raziskavi vnosa nekaterih esencialnih elementov so namreč odkrili, da je vnos Cu pri dializnih bolnikih v povprečju dosegel le do 40% priporočenega vnosa (50).

Pomanjkanje Cu je pri dializnih bolnikih povezano s srčno-žilnimi boleznimi in anemijo (46). Srčno-žilne bolezni so glavni vzrok smrti med dializnimi bolniki (6). Pomanjkanje Cu

sicer ni primarni razlog za nastanek srčno-žilnih bolezni, lahko pa sodeluje pri razvoju bolezni. Bolniki z ishemično boleznijo srca imajo znižane koncentracije Cu, pri bolnikih s hipertenzijo pa so dokazali nižje aktivnosti encima lizil oksidaze (19). Pravilno delovanje lizil oksidaze je še posebej pomembno v arterijah, saj postane tam zaradi nižje aktivnosti encima vezivno tkivo šibkejše (14, 15, 19). Anemija se pri dializnih bolnikih razvije zaradi premajhne sinteze eritropoetina v okvarjenem ledvičnem tkivu. Za zdravljenje anemije dializni bolniki prejemajo rekombinantni eritropoetin (6). Pomanjkanje Cu pri dializnih bolnikih lahko poslabša anemijo (51), prav tako pa je lahko vzrok za anemijo, ki se ne odziva na eritropoetin (52).

4.1.2 Cink

Rezultati analize Zn v plazmi so zbrani v Preglednici V in grafično prikazani na Sliki 3. Podatki so bili pri kontrolni skupini porazdeljeni normalno, pri dializnih bolnikih pa ne.

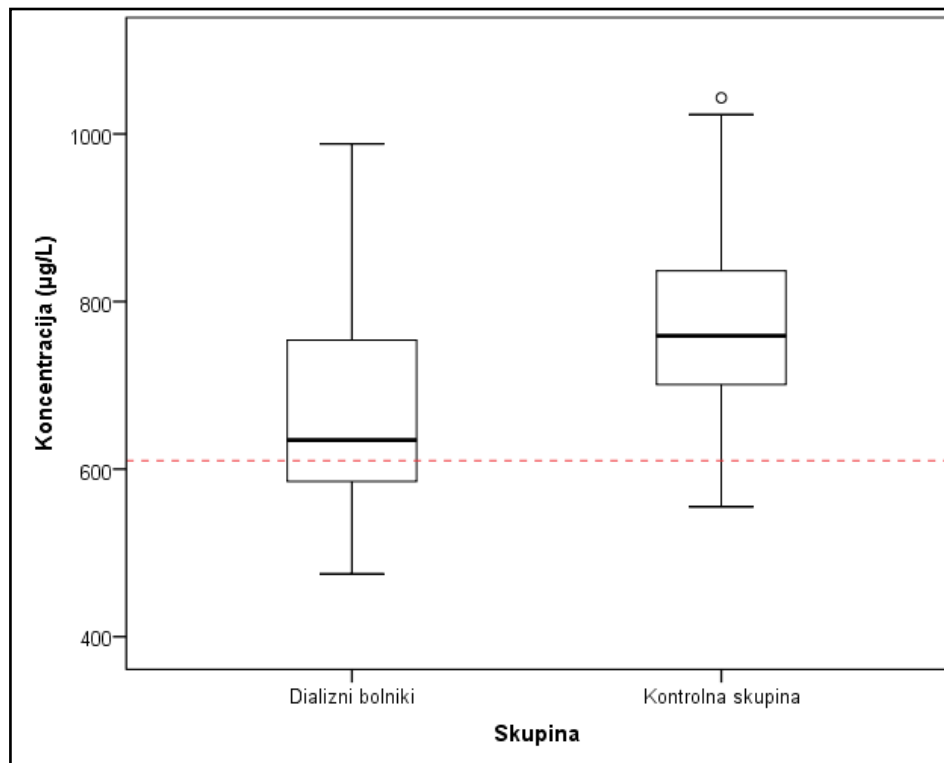
Preglednica V: Rezultati analize Zn

		Število preiskovancev	Srednja vrednost ($\mu\text{g/L}$)	Razpon koncentracij ($\mu\text{g/L}$)
Plazma	Dializni bolniki	80	634,7 ^a	474,8 - 988,1
	Kontrolna skupina	108	769,1 ^b	555,2 - 1043,1

^a Mediana

^b Aritmetična sredina

Ugotovili smo, da so koncentracije Zn v plazmi pri dializnih bolnikih statistično pomembno nižje kot pri kontrolni skupini ($p < 0,0005$). V večini raziskav, so tako kot mi, določili nižje koncentracije Zn pri dializnih bolnikih (21, 23, 31, 42, 43, 45). El-Habibi in sodelavci v svoji raziskavi niso opazili razlik med dializnimi bolniki in kontrolno skupino (44). 28 od 80 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Zn v plazmi pod referenčno mejo 610 $\mu\text{g/L}$, kar predstavlja 35% bolnikov. 8 od 108 kontrolnih preiskovancev je imelo koncentracijo pod referenčno mejo, kar je 7,4%.



Slika 3: Primerjava koncentracij Zn v plazmi. Rdeča črta je spodnja referenčna meja za Zn v plazmi (610 µg/L)

Možni vzroki za pomanjkanje Zn pri dializnih bolnikih so nezadosten vnos, zmanjšana absorpcija v GIT, zmanjšane koncentracije albumina ali spremembe volumna plazme (45, 46, 47). Znižane koncentracije verjetno niso posledica izgube pri dializi, ker so koncentracije Zn v plazmi neposredno po dializi višje kot pred dializo (31, 45). Zn se torej z dializo ne izgublja, višje koncentracije v plazmi po dializi pa bi lahko bile posledica koncentriranja krvi zaradi dialize, tako kot je opisano pri Cu. Zn je vezan na prenašalna proteina albumin in α_2 -makroglobulin, ki ne prehajata membrane hemodializatorja (6). S tem ko se med dializo bolnikom zmanjša volumen plazme, se poveča koncentracija prenašalnih proteinov (47) in posledično Zn. V naši raziskavi so bili vzorci odvzeti tik pred dializo. Zaradi hipervolemije (49) bi lahko bile koncentracije prenašalnih proteinov, in s tem Zn, pred dializo znižane, s tem ko se med dializo zmanjša volumen plazme (47) pa se koncentracija poveča (31, 45). V raziskavah dnevnega vnosa esencialnih elementov so ugotovili, da dializni bolniki s hrano zaužijejo premalo Zn (51, 53, 54), kar bi lahko pomenilo da so nižje koncentracije posledica premajhnega vnosa. Možen razlog za nižje koncentracije Zn je nižja koncentracija prenašalnega proteina albumina, kar je zaradi podhranjenosti pogosto pri dializnih bolnikih. Dializni bolniki so podhranjeni zaradi slabšega apetita, kronična presnovna acidoza pa poveča katabolizem beljakovin v

telesu (6). Če je razlog nezadosten vnos, bi morali bolniki uživati prehranske dodatke z Zn, ki bi normalizirali koncentracije (21, 31).

Pomanjkanje Zn pri dializnih bolnikih lahko povzroči ali pa poslabša številna stanja, kot so anoreksija, disgevizija, znižan HDL, spremembe kognitivnih funkcij in znižana aktivnost superoksid dismutaze (51, 55). Yang in sodelavci so ugotovili, da pri dializnih bolnikih s koncentracijo Zn v plazmi pod 722 µg/L obstaja večja verjetnost za hospitalizacijo zaradi okužb, v primerjavi s tistimi s koncentracijo nad 722 µg/L. Prav tako so ugotovili, da imajo dializni bolniki s koncentracijami Zn nad 722 µg/L na splošno večjo verjetnost za preživetje (56). Naše rezultate lahko primerjamo z njihovimi, saj so tako kot mi, vzorce odvzeli pred dializo, jih analizirali z ICP-MS, prav tako so tudi imeli enako spodnjo referenčno vrednost za Zn v plazmi (610 µg/L). V naši raziskavi je imelo 57 bolnikov (71 %) plazemske koncentracije Zn nižje od 722 µg/L.

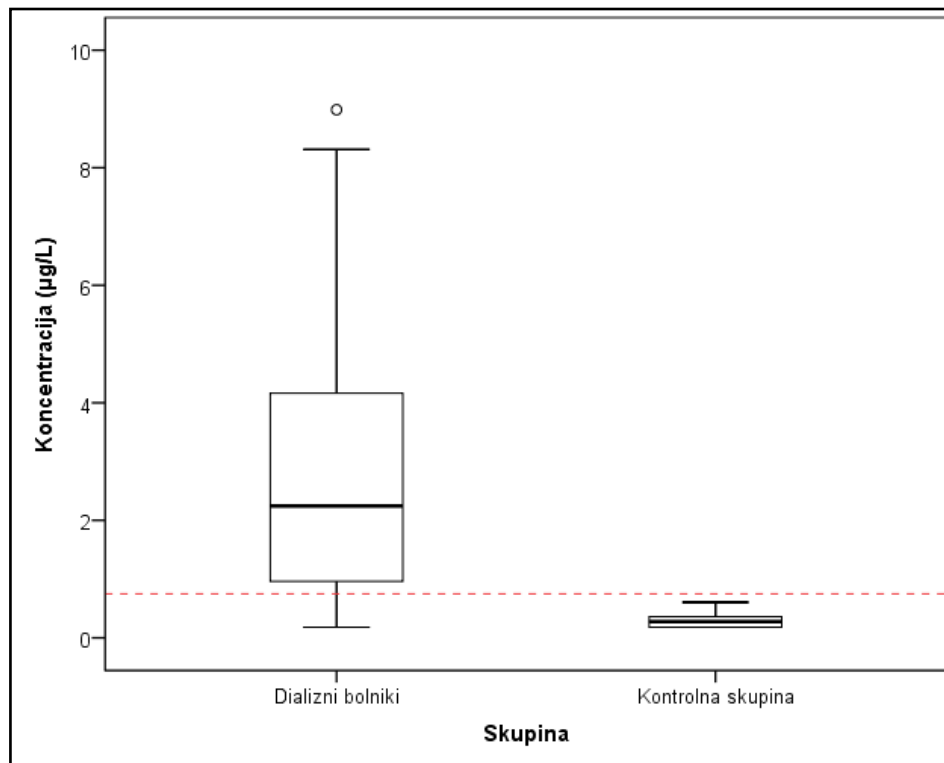
4.1.3 Krom

Rezultati analize Cr v plazmi so zbrani v Preglednici VI in grafično prikazani na Sliki 4. Podatki so bili pri obeh porazdeljeni nenormalno.

Preglednica VI: Rezultati analize Cr

		Število preiskovancev	Mediana (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Plazma	Dializni bolniki	78	2,2	0,18 - 8,9
	Kontrolna skupina	107	0,28	0,18 - 0,6

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v plazmi pomembno višje koncentracije Cr kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$), kar se sklada z ugotovitvami meta analize 128 raziskav in ostalih (11, 21, 23, 31, 57, 58). El-Habibi in sodelavci so v svoji raziskavi pri dializnih bolnikih določili nižje koncentracije Cr kot pri kontrolni skupini (44). 61 od 78 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Cr v plazmi višjo od referenčne meje 0,75 µg/L, kar predstavlja 78,2 % bolnikov. Vsi kontrolni preiskovanci so imeli koncentracije v referenčnem območju.



Slika 4: Primerjava koncentracij Cr v plazmi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Cr v plazmi (0,75 µg/L)

Vzroki za višje koncentracije Cr pri dializnih bolnikih so vnos preko dializne tekočine in okrnjeno izločanje preko ledvic, ter sproščanje Cr iz igel, ki se uporabljajo pri dializi. Dokazali so namreč, da je koncentracija Cr v serumu po končani dializi višja kot pred dializo, ter da je koncentracija Cr v iztrošenem dializatu nižja kot v sveži dializni raztopini, kar kaže na difuzijo Cr iz dializne raztopine v kri (23). Če je koncentracija Cr v dializni tekočini višja kot koncentracija proste frakcije Cr v plazmi, se preko membrane hemodializatorja vzpostavi koncentracijski gradient in Cr iz dializne tekočine difundira v plazmo (57). Prav tako so opazili, da se Cr sprošča iz dializnih igel, kar zviša koncentracije (23, 55). Cr se pri zdravih osebah izloča preko ledvic (14, 15, 25), pri dializnih bolnikih pa to ni več mogoče, zato se Cr kopiči. Možen vzrok za zvišane koncentracije Cr bi lahko bilo tudi potencialno prejetje parenteralne prehrane, saj so pri bolnikih na parenteralni prehrani z normalno delujočimi ledvicami našli do 21-krat višje plazemske koncentracije Cr od referenčne meje (23).

Ni znano ali so tako zvišane koncentracije Cr pri dializnih bolnikih tudi klinično pomembne, vsekakor pa se jim je priporočljivo izogibati (23). V kosteh dializnih bolnikov so našli zvišano vsebnost Cr, kar nakazuje na kopičenje elementa v kosteh, vendar niso

odkrili, da bi to kopičenje vplivalo na potek renalne osteodistrofije (57, 59). Pravzaprav ne moremo z gotovostjo trditi ali smo merili koncentracijo esencialnega Cr^{3+} (14, 15) ali karcinogenega in genotoksičnega Cr^{6+} (20, 25, 26), ker aparat ICP-MS teh dveh oblik ne loči. Glede na to, da se Cr^{6+} v eritrocitih in v plazmi hitro reducira v netoksično obliko Cr^{3+} (60), domnevamo, da smo izmerili slednjo.

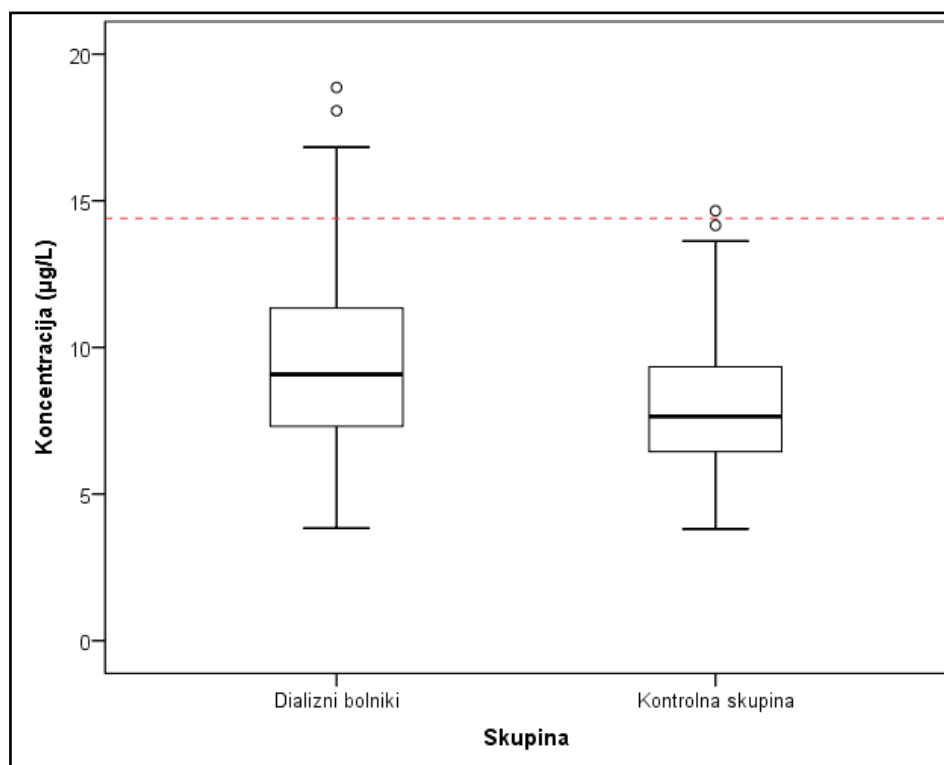
4.1.4 Mangan

Rezultati analize Mn v krvi so zbrani v Preglednici VII in grafično prikazani na Sliki 5. Pri dializnih bolnikih so bili podatki porazdeljeni normalno, pri kontrolni skupini pa ne.

Preglednica VII: Rezultati analize Mn

		Število preiskovancev	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	Razpon koncentracij ($\mu\text{g/L}$)
Kri	Dializni bolniki	77	9,38 ^a	3,84 - 18,86
	Kontrolna skupina	105	7,65	3,81 - 14,66

^a Aritmetična sredina



Slika 5: Primerjava koncentracij Mn v krvi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Mn v krvi (14,4 $\mu\text{g/L}$)

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v krvi statistično pomembno ($p = 0,002$) višje koncentracije Mn kot kontrolna skupina. Podatki o Mn pri dializnih bolnikih se v literaturi razlikujejo, nekateri so našli znižan Mn (21, 43, 44), pri eni raziskavi niso ugotovili razlik med koncentracijami Mn med dializnimi bolniki in kontrolno skupino (45), nekateri pa so pri dializnih bolnikih našli zvišane koncentracije Mn (11, 61). 4 od 77 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Mn v krvi zvišano nad zgornjo referenčno mejo 14,4 $\mu\text{g/L}$, kar predstavlja 5,2 % bolnikov. 1 od 105 kontrolnih preiskovancev je imel koncentracijo višjo od referenčne meje, to je 0,95 %.

Koncentracije Mn pri dializnih bolnikih so lahko višje zaradi povečanega vnosa, zaradi okoljske in poklicne izpostavljenosti ali zaradi difuzije iz dializne raztopine (46). Mn se izloča preko jeter, zato domnevamo, da okvara ledvic ni razlog za zvišane koncentracije. V večini raziskav so pri dializnih bolnikih odkrili pomanjkanje Mn, in sumijo, da je to posledica izgub med dializo. Do zvišanih koncentracij pa lahko pride, če je dializna raztopina kontaminirana z Mn (61). V Smernicah za hemodializo britanskega združenja nefrologov (10) ni podanih maksimalnih dovoljenih koncentracij za Mn v vodi za dializo, prav tako ni podane maksimalne dovoljene koncentracije v Evropski Farmakopeji (62).

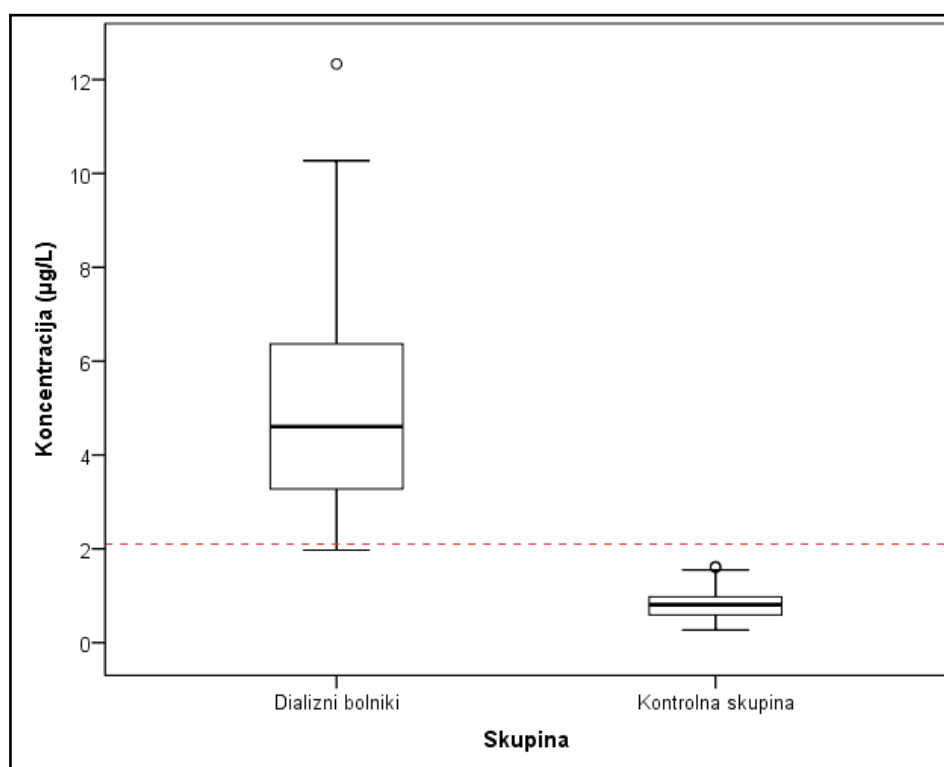
Posledice kronične izpostavljenosti visokim koncentracijam Mn se izrazijo kot nevrološki sindrom manganizem. Simptomi so podobni Parkinsonovi bolezni – tremor, podaljšan reakcijski čas, poslabšanje spomina, motnje koordinacije in hoje ter psihiatrične motnje. Kronična izpostavljenost nižjim koncentracijam Mn povzroča izgubo koordinacije in ravnotežja, pozabljivost, anksioznost in nespečnost (14, 15, 28). Da Silva in sodelavci so odkrili simptome manganizma pri dializnih bolnikih z rahlo zvišanimi serumskimi koncentracijami Mn (61). Ker smo v naši raziskavi merili koncentracijo Mn v krvi, Da Silva in sodelavci pa v serumu (61), ne moremo interpretirati ali se lahko enaki simptomi pojavijo tudi pri naših preiskovancih. Opisan je primer manganizma pri dializnem bolniku, ki je kot prehranski dodatek jemal ekstrakt alge *Chlorella*, ki je bogat z Mn (63). Prehranski dodatek te alge je široko dostopen tudi v Sloveniji, tako da bi lahko prišlo do podobnega primera tudi pri nas.

4.1.5 Molibden

Rezultati analize Mo v plazmi so zbrani v Preglednici VIII in grafično prikazani na Sliki 6. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica VIII: Rezultati analize Mo

		Število preiskovancev	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	Razpon koncentracij ($\mu\text{g/L}$)
Plazma	Dializni bolniki	79	4,6	1,97 - 12,33
	Kontrolna skupina	106	0,81	0,27 - 1,62



Slika 6: Primerjava koncentracij Mo v plazmi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Mo v plazmi (2,1 $\mu\text{g/L}$)

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v plazmi statistično pomembno višje koncentracije Mo kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). Raziskav, ki bi določale koncentracije Mo pri dializnih bolnikih ni veliko, vendar so rezultati v tistih, ki smo jih našli, skladni z našimi ugotovitvami, da so koncentracije Mo pri dializnih bolnikih višje (42, 64). 78 od 79 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Mo v plazmi višjo od zgornje referenčne meje 2,1 $\mu\text{g/L}$, kar predstavlja 98,7 % bolnikov. Nihče iz kontrolne skupine ni imel koncentracije višje od referenčne vrednosti.

Koncentracije Mo pri dializnih bolnikih so lahko višje zaradi povečanega vnosa s homeopatskimi zdravili, okoljske ali poklicne izpostavljenosti, zmanjšane izločanja preko ledvic ali zaradi difuzije iz dializne raztopine (46). V raziskavi o Mo pri dializnih bolnikih so ugotovili, da se njegova koncentracija v serumu med dializo skoraj prepolovi (64), kar bi lahko pomenilo, da se med dializo izgublja v dializat. Mo se pri zdravih osebah pretežno izloča z urinom, ker se pri dializnih bolnikih zaradi okvarjenih ledvic ne izloča, se kopiči. Pri njih se sicer izloča pri procesu dialize, vendar očitno ne dovolj, da bi se koncentracije v plazmi normalizirale.

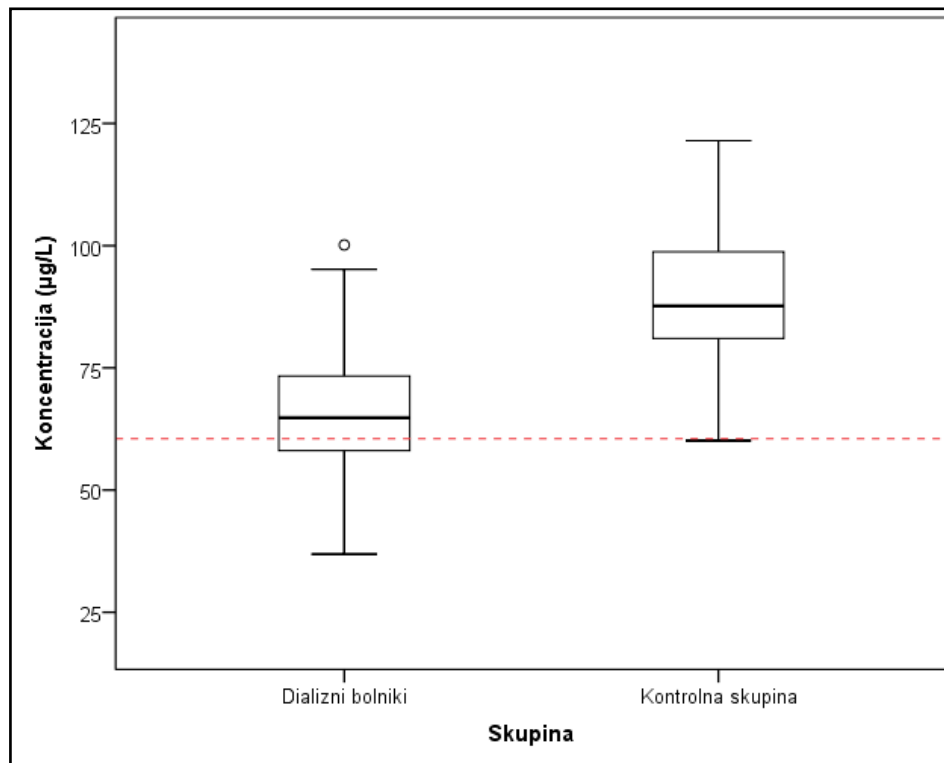
Podatkov o toksičnosti Mo ni veliko, še manj pa o njegovi toksičnosti pri dializnih bolnikih. Mo ni zelo toksičen, pri Armencih, ki živijo na območju z visoko vsebnostjo Mo v prsti so opazili visoko zvišane koncentracije Mo v krvi, skoraj 300-krat višje od referenčnih vrednosti. Pri njih so opazili zvišano koncentracijo sečne kisline v krvi, zvišano aktivnost tkivne ksantin oksidaze, boleče sklepe in simptome, podobne protinu (14, 65). Pri osebah z visoko poklicno izpostavljenostjo so opazili zvišane koncentracije sečne kisline in ceruloplazmina v serumu ter boleče sklepe, pri raziskavi, kjer so zdravi moški prejeli do 1,5 mg Mo na dan pa niso opazili toksičnih učinkov (14, 65). Pri dializnih bolnikih z artritidom so odkrili visoke serumske koncentracije Mo (povprečno 128 µg/L), zato domnevajo, da kopičenje Mo sodeluje pri nastanku artritisa (65). Dializni bolniki v naši raziskavi nimajo tako visokih koncentracij Mo, zato teh simptomov ne pričakujemo.

4.1.6 Selen

Rezultati analize Se v plazmi so zbrani v Preglednici IX in grafično prikazani na Sliki 7. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni normalno.

Preglednica IX: Rezultati analize Se

		Število preiskovancev	Aritmetična sredina (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Plazma	Dializni bolniki	80	64,81	36,88 - 100,14
	Kontrolna skupina	108	89,21	60,1 - 121,5



Slika 7: Primerjava koncentracij Se v plazmi. Rdeča črta je spodnja referenčna meja za Se v plazmi (60,5 µg/L)

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v plazmi statistično pomembno nižje koncentracije Se kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). V vseh pregledanih raziskavah so ugotovili, da so koncentracije Se pri dializnih bolnikih znižane (21, 31, 42, 43, 44, 45, 55, 58). 26 od 80 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Se v plazmi nižjo od spodnje referenčne meje 60,5 µg/L, to predstavlja 32,5 % bolnikov. Le 1 od 108 kontrolnih preiskovancev je imel koncentracijo Se nižjo od spodnje referenčne meje, to je 0,93 %.

Vzroki za nižje koncentracije Se pri dializnih bolnikih so nezadosten vnos s prehrano in izguba Se pri postopku dialize (57, 66). V raziskavi vnosa esencialnih elementov pri dializnih bolnikih so ugotovili, da le-ti zaužijejo premajhno količino Se (53). Se je v plazmi vezan na plazemske proteine selenoprotein P in albumin, vendar je afiniteta za vezavo nizka, zato se lažje sprosti s proteinov in med postopkom dialize izgublja (31). Poleg tega pa so koncentracije v dializni raztopini dovolj nizke, da koncentracijski gradient povzroči premik Se iz krvi v dializno raztopino (57).

Nizke koncentracije Se pri dializnih bolnikih povezujejo s srčno-žilnimi boleznimi (kardiomiopatijo, hipertenzijo, srčno odpovedjo, koronarna bolezen), anemijo in slabšim delovanjem imunskega sistema (21, 31, 43, 45, 51). Pri dializnih bolnikih so zaznali

povečano pojavnost malignih bolezni, kar povezujejo s pomanjkanjem Se (45, 57). Znano je, da pomanjkanje Se pri dializnih bolnikih poveča dovzetnost za učinke oksidativnega stresa, ker je Se kofaktor glutation peroksidaze, aktivnost encima pa je pri pomanjkanju Se zmanjšana (21, 45). Ugotovili so tudi, da so pri dializnih bolnikih nizke koncentracije Se povezane z večjim tveganjem za smrt, predvsem za smrt zaradi okužb. Znižane koncentracije Se so namreč povezane s slabšim delovanjem imunskega sistema, zato je pri teh bolnikih večja verjetnost za okužbe (66). Pri bolnikih s pomanjkanjem Se ga je potrebno nadomeščati s prehranskimi dodatki (6), ki pomagajo normalizirati koncentracije in izboljšajo zdravstveno stanje (31).

4.2 Toksični elementi

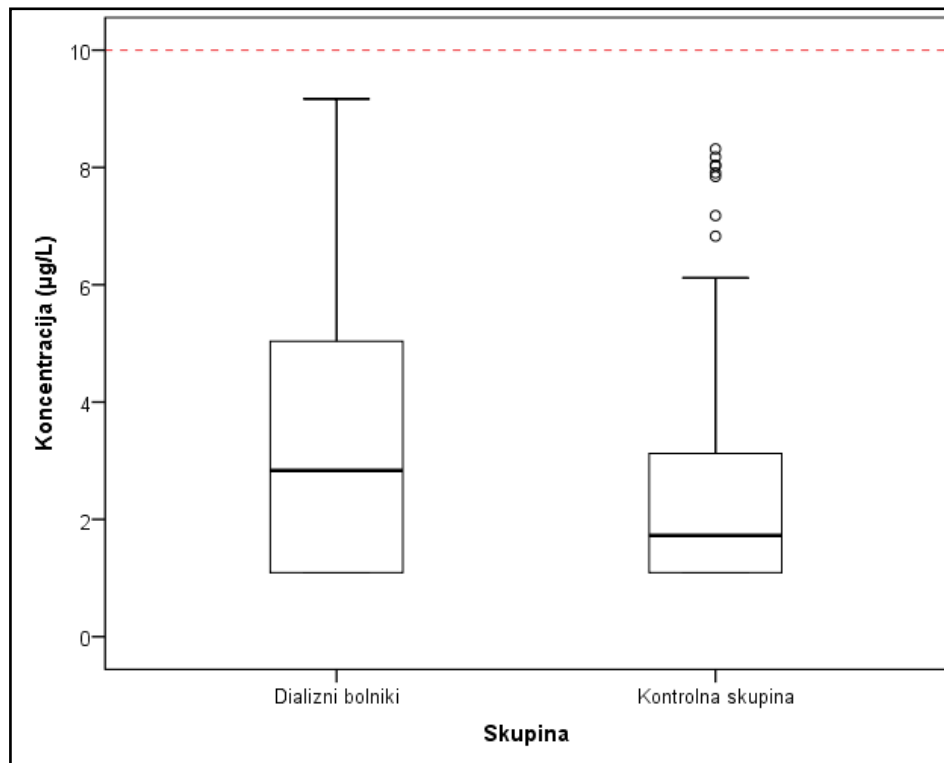
4.2.1 Aluminij

Rezultati analize Al so zbrani v Preglednici X in grafično prikazani na Sliki 8. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica X: Rezultati analize Al

		Število preiskovancev	Mediana (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Plazma	Dializni bolniki	79	2,83	1,09 - 9,17
	Kontrolna skupina	104	1,73	1,09 - 8,32

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v plazmi statistično pomembno višje koncentracije Al kot kontrolna skupina ($p = 0,005$). Nihče od dializnih bolnikov v naši raziskavi niti od kontrolnih preiskovancev ni imel koncentracije Al nad referenčno mejo 10 µg/L. Novejših raziskav, kjer bi določali Al pri dializnih bolnikih ni veliko, Al niti ni bil vključen v metaanalizo 128 raziskav (21). Pri obstoječih raziskavah so pri dializnih bolnikih določili višje koncentracije Al kot pri kontrolni skupini, prav tako so imeli bolniki na splošno višje koncentracije Al kot pri nas (11, 67, 68). Omenjene raziskave so iz razvijajočih se držav, v razvitem svetu pa so zvišane koncentracije Al pri dializnih bolnikih zelo redke, saj so prenehali z uporabo fosfatnih vezalcev z Al in izboljšali proces prečiščevanja vode za dializo (5, 69, 70, 71).



Slika 8: Primerjava koncentracij Al v plazmi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Al v plazmi (10 µg/L)

Pri zdravih osebah se Al izloča preko ledvic (20, 32), pri bolnikih z okvarjenimi ledvicami pa se ne more izločati in se zato kopiči (69). Kopiči se tudi, če je prisoten v dializni raztopini, saj lahko prehaja membrano hemodializatorja (69). Maksimalna dovoljena koncentracija Al v vodi za dializo je 10 µg/L (10), vendar lahko prehaja iz dializne raztopine v kri tudi, če je njegova koncentracija v dovoljenem območju. Al je v plazmi večinoma vezan na transferin, od 17 do 23 % pa je proste frakcije, ki lahko difundira. To pomeni, da se med dializno raztopino in krvjo lahko vzpostavi koncentracijski gradient, če je koncentracija Al v dializni raztopini višja od koncentracije proste frakcije v plazmi (72). V preteklosti je bil dodaten razlog za zvišane koncentracije Al uživanje fosfatnih vezalcev z Al, saj se del tega Al absorbira in kopiči v telesu, ker se zaradi okvarjenih ledvic ne izloča (20, 32, 69).

Pri dializnih bolnikih lahko kopičenje Al povzroči okvare kosti, encefalopatijo in mikrocitno anemijo (69, 71). Al se kopiči v kosteh (20, 59, 69), kjer moti fiziološko izmenjavo kalcija med kostjo in plazmo, zato postane kalcij nedostopen za resorpcijo (20). Al naj bi spremenil aktivnosti encimov kisle in alkalne fosfataze, ki sta udeležena v resorpciji in sintezi kostnine (32, 73). Kopičenje Al v kostnem mozgu lahko povzroči mikrocitno anemijo, ki se ne odziva na zdravljenje z železom in rekombinantnim eritropoetinom (6). Kopičenje Al zavre hematopoezo, s tem ko reverzibilno blokira sintezo

hema, stopnja anemije pa je odvisna od količine Al (74). Sindrom dializne encefalopatije oz. dializna demenca nastane zaradi kopičenja Al v možganih. Je degenerativni nevrološki sindrom, za katerega je značilna postopna izguba motorične, govorne in kognitivne funkcije. Do akutne oblike te bolezni pride pri uporabi z Al kontaminiranih dializnih raztopin, koncentracije Al so pogosto zelo visoke, od 150 do 1000 µg/L. Nastanek nevrotoksičnosti je hiter, simptomi so zmedenost, trzanje mišic, tonično-klonični napad, koma in smrt. Koncentracije Al v plazmi so pri akutni obliki dializne encefalopatije običajno nad 500 µg/L (20, 32, 69). Klasična oblika se razvije pri dializnih bolnikih, ki se zdravijo že več let. Simptomi so motnje govora, trzanje mišic, halucinacije in paranoja. Stanje se s časom poslabšuje in bolnike je potrebno zdraviti, sicer običajno umrejo v 6 do 12 mesecih po nastanku simptomov. Koncentracije Al v plazmi so nižje kot pri akutni obliki, od 150 do 300 µg/L (20, 32, 69).

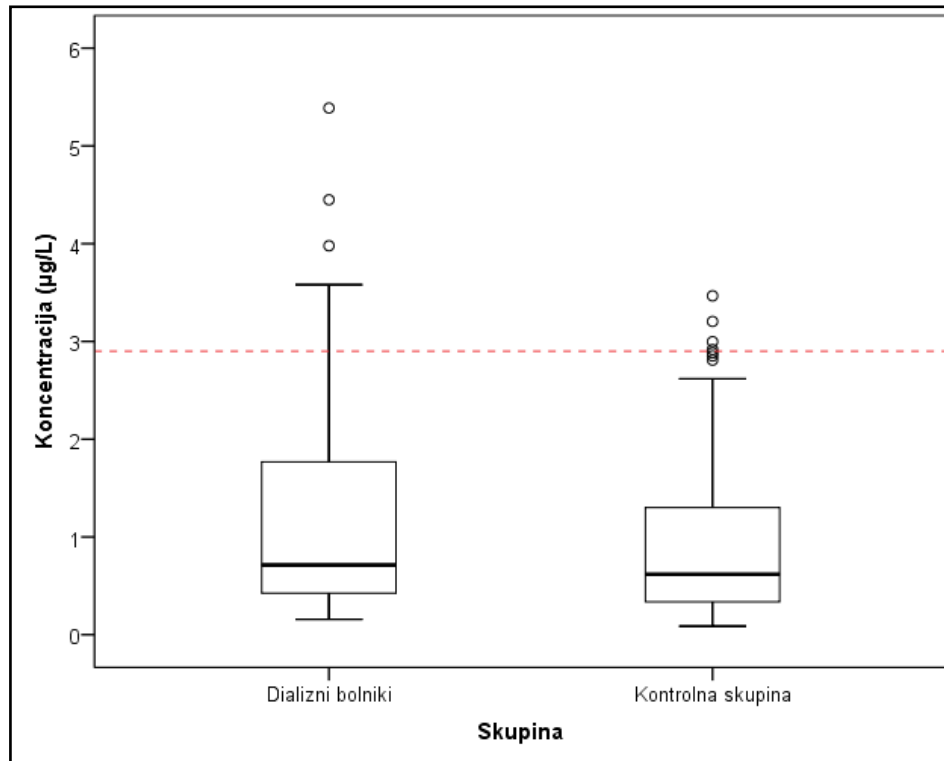
Nihče od bolnikov v naši raziskavi ni imel koncentracije Al nad 20 µg/L, zato pri bolnikih ne pričakujemo zapletov zaradi toksičnosti Al (20). Po priporočilih National Kidney Foundation–Kidney Disease Outcomes Quality Initiative je potrebno spremljati plazemsko koncentracijo Al pri dializnih bolnikih vsaj enkrat na leto, oziroma na 3 mesece, če prejemajo fosfatne vezalce z Al. Po priporočilih mora biti koncentracija Al v plazmi pod 10 µg/L (69). Ugotavljamo, da imajo dializni bolniki vključeni v našo raziskavo dobro urejene koncentracije Al, saj imajo vsi koncentracije pod 10 µg/L.

4.2.2 Arzen

Rezultati analize As so zbrani v Preglednici XI in grafično prikazani na Sliki 9. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica XI: Rezultati analize As

	Število preiskovancev	Mediana (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Kri Dializni bolniki	74	0,71	0,16 - 5,39
Kontrolna skupina	102	0,62	0,09 - 3,47



Slika 9: Primerjava koncentracij As v krvi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za As v krvi (2,9 µg/L)

Ugotovili smo, da ni statistično pomembnih razlik v koncentracijah As v krvi med dializnimi bolniki in kontrolno skupino ($p = 0,088$), kar se razlikuje od podatkov v literaturi. Prodanchuk in sodelavci so pri dializnih bolnikih določili nižje koncentracije As (11), ostali raziskovalci pa ugotavljajo, da so koncentracije As pri dializnih bolnikih višje (42, 45, 58, 75, 76). 7 od 74 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo As v krvi višjo od zgornje referenčne meje 2,9 µg/L, kar predstavlja 9,46 %. 4 od 102 kontrolnih preiskovancev je imelo koncentracijo višjo od zgornje referenčne meje, to je 3,9 %.

Organske in anorganske oblike As se izločajo preko ledvic, kar pri dializnih bolnikih zaradi okvarjenih ledvic ni mogoče, zato so pri večini raziskav pri dializnih bolnikih določili višje koncentracije (75, 76). Čeprav je dializa zelo učinkovita pri odstranjevanju As, koncentracije so v krvi in serumu po dializi nižje kot pred dializo (45), celo v referenčnem območju (76), so očitno bolniki do naslednje dialize izpostavljeni tolikšnim količinam As da imajo zopet zvišane koncentracije. Na tej točki ni jasno, zakaj imajo bolniki v naši raziskavi povečini normalne koncentracije As, morda so preko hrane izpostavljeni manjšim količinam As kot bolniki v ostalih raziskavah. Brez podatkov o načinu prehranjevanja ne moremo delati primerjav z ostalimi raziskavami.

Kronična izpostavljenost As lahko povzroči srčno-žilne bolezni, sladkorno bolezen in maligne spremembe. Poleg tega je As nevrotoksičen, nefrotoksičen in hepatotoksičen (1, 33, 45, 77). Toksičnost As je odvisna od oblike, zato je pomembno vedeti, v kateri obliki se nahaja pri dializnih bolnikih (76). V serumu dializnih bolnikov se večina As nahaja v netoksičnih oblikah arzenobetain in DMA, toksične oblike so bile v raziskavi (76) pod mejo detekcije, zato ni jasno, ali ima kopičenje As pri dializnih bolnikih sploh toksičen vpliv (45). Mi smo določali celokupni As v krvi, saj aparat ICP-MS brez predhodne separacije s tekočinsko kromatografijo (HPLC) ne loči oblik As.

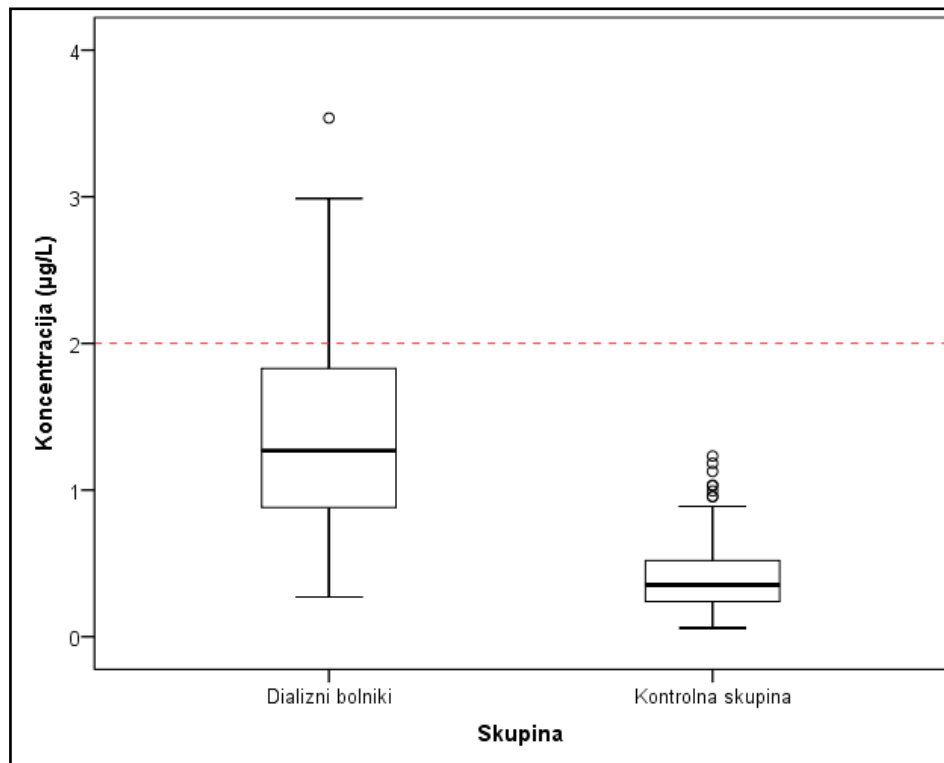
4.2.3 Kadmij

Rezultati analize Cd so zbrani v Preglednici XII in grafično prikazani na Sliki 10. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica XII: Rezultati analize Cd

		Število preiskovancev	Mediana (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Kri	Dializni bolniki	77	1,27	0,27 - 3,54
	Kontrolna skupina	102	0,35	0,06 - 1,23

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v krvi statistično pomembno višje koncentracije Cd kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). Naši rezultati se skladajo z ugotovitvami ostalih raziskovalcev, da so koncentracije Cd pri dializnih bolnikih višje kot pri kontrolni skupini (11, 21, 55, 58, 75, 78). 13 od 77 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Cd višjo od zgornje referenčne meje 2,0 µg/L, kar je 16,9 %. Nihče iz kontrolne skupine ni imel koncentracije višje od zgornje referenčne meje.



Slika 10: Primerjava koncentracij Cd v krvi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Cd (2 µg/L)

Koncentracije Cd so pri dializnih bolnikih višje zaradi zmanjšane sposobnosti izločanja Cd zaradi okvarjenih ledvic (75, 78) in ker se z dializo Cd ne odstranjuje iz krvnega obtoka. Dializa ni učinkovita pri odstranjevanju Cd, ker se večina Cd nahaja v eritrocitih (35) in ne more prehajati membrane dializatorja. To potrjuje tudi raziskava Dlugaszek in sodelavcev, kjer so določali koncentracije Cd v sveži dializni raztopini in v porabljenem dializatu ter ugotovili, da so koncentracije Cd pred in po dializi enake, kar nakazuje na to, da Cd ne prehaja dializne membrane. Povprečna koncentracija v sveži dializni raztopini v njihovi raziskavi je bila 1,09 µg/L, povprečna koncentracija v porabljenem dializatu pa 1,07 µg/L (79), kar rahlo presega maksimalno dovoljeno koncentracijo 1 µg/L glede na Smernice za hemodializo britanskega združenja nefrologov (10). V drugi raziskavi, kjer so določali koncentracijo Cd v krvi pred in po dializi so ugotovili, da se koncentracije v krvi pred in po dializi ne razlikujejo (31), kar se sklada z ugotovitvami Dlugaszek in sodelavcev (79), da ne pride do prenosa Cd med dializo.

Cd je toksičen za ledvice, v njih se kopiči, lahko povzroči disfunkcijo ledvic s proteinurijo (20, 78) in poveča verjetnost za nastanek KLB (31). Cd se v glomerulih filtrira vezan na metalotionein in reabsorbira v proksimalnem tubulu. V tubulnih celicah se metalotionein razgradi, Cd pa sprosti v citoplazmo. Prosti Cd se v tubulnih celicah kopiči in veže na proteine, ki zaradi tega spremenijo konformacijo in denaturirajo (20, 34). Na tak način

lahko Cd ali povzroči KLB ali pa zaradi kakšnega drugega razloga poškodovane ledvice še dodatno poškoduje ter pospeši in sodeluje pri nastanku KLB.

Ugotovili so, da se pri dializnih bolnikih Cd kopiči v kosteh (59). Kopičenje povezujejo s kostnimi okvarami (46, 78), ki so eden izmed najpomembnejših vzrokov za težave pri dializnih bolnikih (6). Mehanizmi toksičnosti Cd v kosteh še niso popolnoma jasni. Ena izmed možnosti je, da Cd uniči tubulne celice, zato se vitamin D tam ne more hidroksilirati v metabolno aktivno obliko 1,25-dihidroksi vitamin D. Zaradi tega se zmanjša absorpcija kalcija v GIT in zmanjša mineralizacija kosti (35). Drugi predlagan mehanizem je, da Cd neposredno učinkuje na kostnino. Predvidevajo, da Cd inhibira osteoblaste in aktivira osteoklaste, posledica pa je zmanjšano nastajanje kostnine in povečana resorpcija kosti (34).

Pri dializnih bolnikih so našli povezavo med zvišanimi koncentracijami Cd v krvi in podhranjenostjo (78), ki je povezana z večjo obolevnostjo in smrtnostjo pri dializnih bolnikih (6). Za zdaj še ni znano ali je med Cd in podhranjenostjo tudi vzročno-posledična povezava (78). Pri isti raziskavi so našli tudi povezavo med zvišanim Cd v krvi in vnetjem (78). Obstajajo dokazi, da je lahko Cd povzročitelj vnetja, saj lahko povzroči lipidno peroksidacijo v srcu, pljučih, jetrih in vranici, in poveča oksidativni stres v tkivih, ker inhibira glutation peroksidazo in superoksid dismutazo, encima, ki sta udeležena v obrambi proti oksidativnemu stresu (34, 46, 78).

Dializni bolniki v naši raziskavi imajo koncentracije Cd, ki so sicer značilne za kadilce (od 1 do 4 $\mu\text{g/L}$) (35). Podatkov o kajenju pri bolnikih nimamo, tako da ne moremo interpretirati ali so zvišane koncentracije pri nekaterih potencialno posledica kajenja. Je pa pri dializnih bolnikih priporočljivo, da se izogibajo kajenju in hrani z visoko vsebnostjo Cd (78).

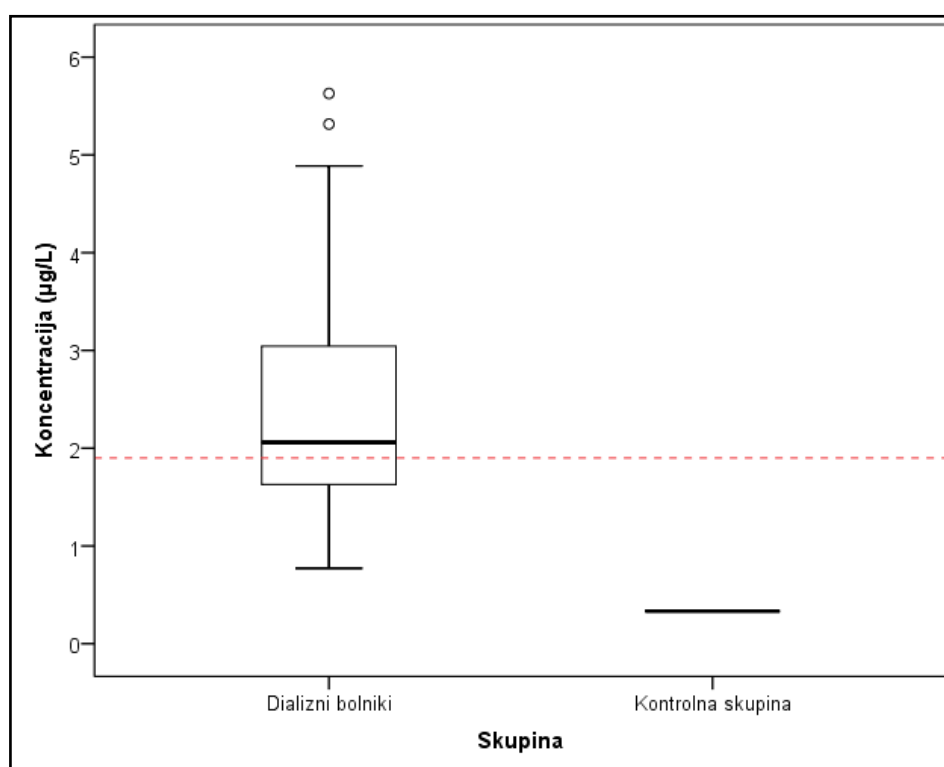
4.2.4 Nikelj

Rezultati analize Ni v plazmi so zbrani v Preglednici XIII in grafično prikazani na Sliki 11. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica XIII: Rezultati analize Ni

	Število preiskovancev	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	Razpon koncentracij ($\mu\text{g/L}$)
Plazma Dializni bolniki	80	2,06	0,77 - 5,63
Kontrolna skupina	94	0,33	0,33 ^a

^a V kontrolni skupini so imeli vsi preiskovanci koncentracijo 0,33 $\mu\text{g/L}$, kar je tudi spodnja meja določljivosti za našo metodo.



Slika 11: Primerjava koncentracij Ni v plazmi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Ni v plazmi (1,9 $\mu\text{g/L}$)

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v plazmi statistično pomembno višje koncentracije Ni kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). V večini raziskav, so tako kot mi ugotovili, da so koncentracije Ni pri dializnih bolnikih višje (21, 43, 45). Prodanchuk in sodelavci so pri dializnih bolnikih odkrili nižje koncentracije kot pri kontrolni skupini (11). 48 od 80 dializnih bolnikov v naši raziskavi je imelo koncentracijo Ni v plazmi višjo od zgornje referenčne meje 1,9 $\mu\text{g/L}$, kar predstavlja 60 % bolnikov. Vsi kontrolni preiskovanci so imeli koncentracijo pod referenčno mejo.

Glavna pot izločanja Ni je preko ledvic, kar je pri dializnih bolnikih onemogočeno, zato se pri njih Ni kopiči (20, 36). Prav tako lahko Ni difundira iz dializne tekočine v kri bolnikov, če je koncentracija Ni v dializni tekočini višja od proste frakcije Ni v plazmi (57). Takoj po dializi so v serumu izmerili višje koncentracije Ni kot pred dializo, kar nakazuje na prenos Ni iz dializne tekočine v kri (45, 80).

Toksičnih učinkov kopičenja Ni pri dializnih bolnikih doslej še niso odkrili (20, 45). Opisan pa je primer akutne zastrupitve z Ni pri dializnih bolnikih, ko se je dializna tekočina kontaminirala z izpiranjem ponikljanega vodnega rezervoarja iz nerjavečega jekla. Med in po dializi so se pri bolnikih pojavili slabost, bruhanje, glavobol in šibkost. Koncentracija Ni v plazmi je bila zelo visoka, 3000 µg/L. Simptomi so spontano izzveneli nekaj ur po končani dializi (81).

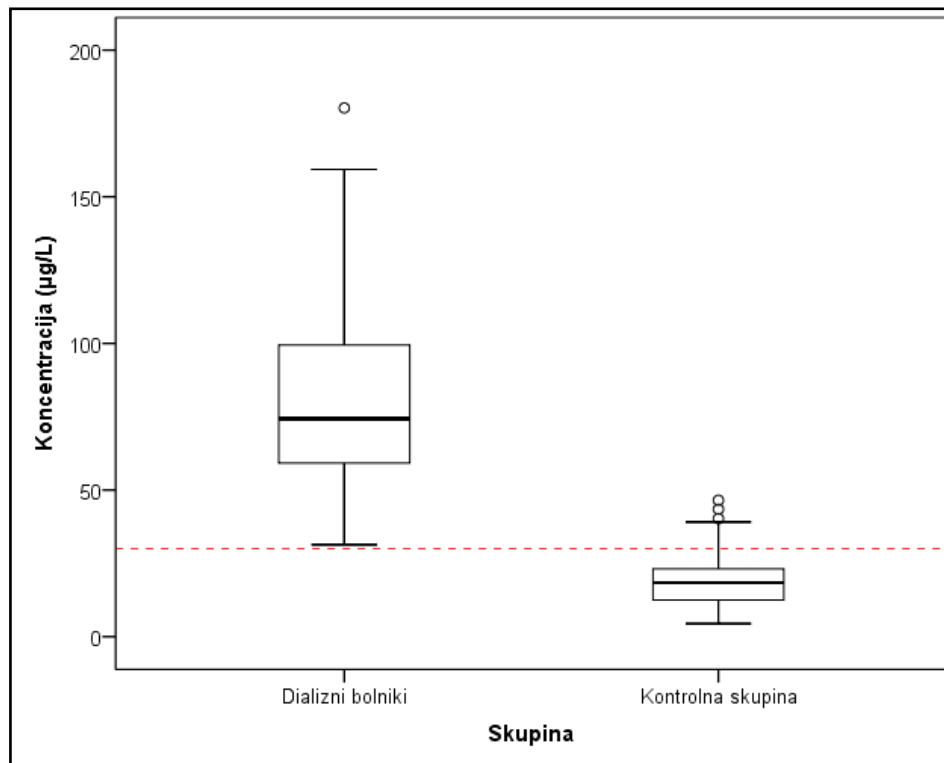
4.2.5 Svinec

Rezultati analize Pb so zbrani v Preglednici XIV in grafično prikazani na Sliki 12. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica XIV: Rezultati analize Pb

		Število preiskovancev	Mediana (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Kri	Dializni bolniki	78	74,33	31,36 - 180,29
	Kontrolna skupina	102	18,42	4,44 - 46,5

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v krvi statistično pomembno višje koncentracije Pb kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). V vseh podobnih raziskavah, so tako kot mi ugotovili, da so koncentracije Pb zvišane (21, 23, 45, 58, 82). Vsi dializni bolniki v naši raziskavi so imeli koncentracijo Pb v krvi nad referenčno mejo 30 µg/L. 11 od 102 kontrolnih preiskovancev je imelo koncentracijo Pb višjo od zgornje referenčne meje, kar predstavlja 10,8 % preiskovancev.



Slika 12: Primerjava koncentracij Pb v krvi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Pb v krvi (30 µg/L)

Pri dializnih bolnikih so koncentracije Pb v krvi zvišane predvsem zaradi popolne ali skoraj popolne izgube ledvične funkcije, zaradi neučinkovitega odstranjevanja s hemodializo pa se koncentracije ne znižajo (31, 45, 82, 83). Pb se s hemodializo ne odstranjuje, ker ga je v krvi kar 99% vezanega na proteine v eritrocitih, in se zato ne more izmenjevati (37). Zaradi tega lahko pri dializnih bolnikih vsakršna izpostavljenost Pb zviša koncentracije v krvi (45, 82). Še en možen razlog za zvišane koncentracije Pb bi bila lahko difuzija iz dializne raztopine v kri, saj so nekateri raziskovalci ugotovili, da so koncentracije Pb v porabljenem dializatu nižje kot v dializni raztopini preden ta vstopi v dializator (79), ter da so koncentracije Pb v krvi po dializi višje kot pred dializo (67). Ker je koncentracija izmenljivega Pb tako nizka, bi lahko že nizka koncentracija Pb v dializni raztopini povzročila koncentracijski gradient in premik Pb iz dializne raztopine v kri. Drugi so ugotovili, da kontaminirana dializna raztopina verjetno ni vzrok za zvišane koncentracije Pb, saj se koncentracije Pb v krvi pred in po dializi niso pomembno razlikovale (45) in da je koncentracija Pb v dializni raztopini močno pod maksimalno dovoljeno koncentracijo 5 µg/L (10, 31). Takšne razlike med raziskavami so verjetno posledica različne kakovosti dializnih tekočin med bolnišnicami in dializnimi centri, saj so imeli Dlugaszek in sodelavci (79) v dializni tekočini 4-krat višje koncentracije Pb od maksimalne dovoljene koncentracije (10).

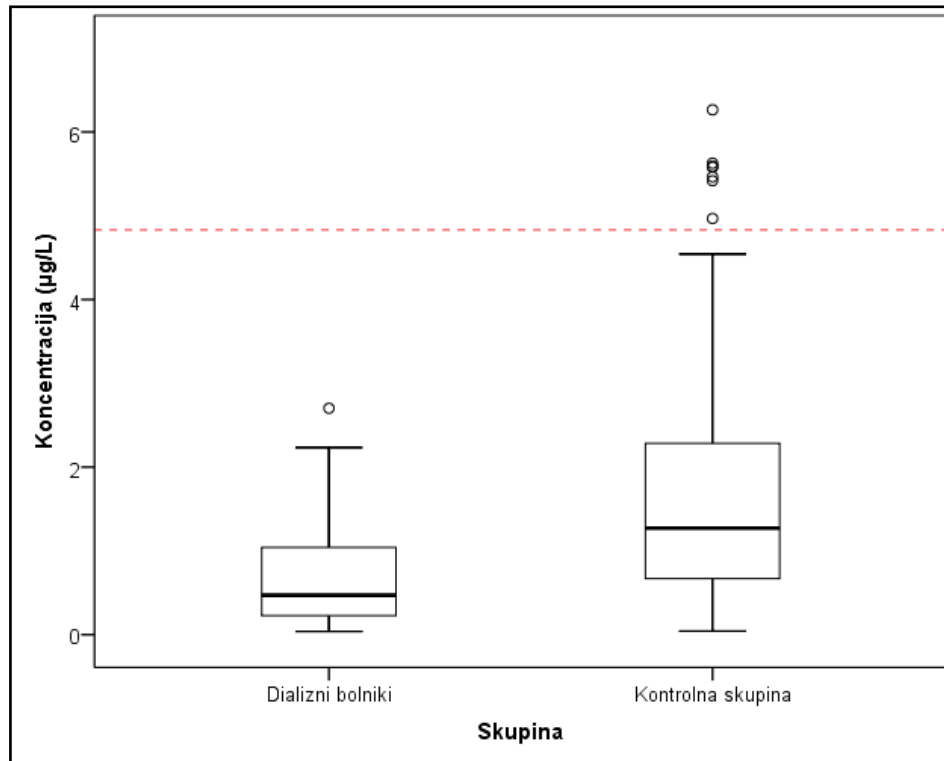
Kopičenje Pb lahko povzroči hipertenzijo, anemijo, okvare ledvic in nevrološke motnje (1, 20, 21, 37). V osnovi je Pb toksičen, saj tvori kovalentne vezi s sulfhidrilnimi skupinami na proteinih in uniči njihovo terciarno strukturo (20). Hipertenzija in slabšanje glomerulne filtracije lahko povzročita ali pa pospešita napredovanje KLB (37). Anemija je znan problem pri dializnih bolnikih, ker se jim v okvarjenih ledvicah eritropoetin ne tvori (6). Pb lahko dodatno poslabša anemijo, ker inhibira encim dehidratazo δ -aminolevulinske kisline, enega od encimov, v sintezni poti hema. Zaradi inhibicije tega encima se v eritrocitih kopiči protoporfirin IX (20, 37). Pri dializnih bolnikih z zvišanimi koncentracijami Pb so v eritrocitih določili pomembno višje koncentracije protoporfirina IX kot pri zdravih (83). Do inhibicije sinteze hema pride že pri krvnih koncentracijah Pb pod 100 $\mu\text{g/L}$ (20, 37). Pri koncentracijah Pb okoli 100 $\mu\text{g/L}$ pride do hipertenzije, nevrološke motnje, kot so periferna nevropatija in vedenjske motnje, pa se pojavijo pri koncentracijah nad 400 $\mu\text{g/L}$ (20, 37). V obsežni raziskavi 927 dializnih bolnikov so ugotovili, da so zvišane koncentracije Pb povezane s povečanim tveganjem za smrt zaradi srčno-žilnih bolezni in okužb. Pri dializnih bolnikih z visoko koncentracijo Pb ($>126,4$ $\mu\text{g/L}$) je razmerje ogroženosti za smrt višje kot pri dializnih bolnikih z nizko koncentracijo Pb ($<85,1$ $\mu\text{g/L}$) (84). V naši raziskavi je imelo 7 bolnikov koncentracije Pb višje od 126,4 $\mu\text{g/L}$.

4.2.6 Živo srebro

Rezultati analize Hg so zbrani v Preglednici XV in grafično prikazani na Sliki 13. Podatki so bili pri obeh skupinah porazdeljeni nenormalno.

Preglednica XV: Rezultati analize Hg

		Število preiskovancev	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	Razpon koncentracij ($\mu\text{g/L}$)
Kri	Dializni bolniki	74	0,47	0,04 - 2,7
	Kontrolna skupina	100	1,27	0,04 - 6,26



Slika 13: Primerjava koncentracij Hg v krvi. Rdeča črta je zgornja referenčna meja za Hg v krvi (4,83 µg/L)

Ugotovili smo, da imajo dializni bolniki v krvi statistično pomembno nižje koncentracije živega srebra kot kontrolna skupina ($p < 0,0005$). Našli smo le eno raziskavo, kjer so primerjali koncentracije Hg med dializnimi bolniki in kontrolno skupino, ugotovili pa so, da med skupinama ni razlik (58). Vsi dializni bolniki v naši raziskavi so imeli koncentracijo Hg v referenčnem območju. 7 od 100 kontrolnih preiskovancev je imelo koncentracije Hg nad zgornjo referenčno mejo, kar predstavlja 7 % preiskovancev.

Zaradi pomanjkanja literature o koncentracijah Hg pri dializnih bolnikih, je interpretacija dobljenega rezultata nekoliko težja. Domnevamo, da je dializa učinkovita pri odstranjevanju Hg iz krvnega obtoka. V Smernicah za hemodializo britanskega združenja nefrologov je maksimalna dovoljena koncentracija Hg v vodi za dializo le 0,2 µg/L (10). Če so koncentracije v dializni tekočini zares tako nizke lahko to pomeni, da se vzpostavi koncentracijski gradient iz krvi proti dializni tekočini in se nevezan Hg iz krvnega obtoka odstranjuje. Razlog za nižje koncentracije Hg pri dializnih bolnikih bi bila lahko manjša izpostavljenost Hg zaradi uživanja manjših količin morske hrane in rib, ki so glavni vir Hg (38). Dializni bolniki sicer nimajo predpisane posebne diete, da bi se morali izogibati uživanju morske hrane in rib (6).

4.3 Vpliv rezidualne diureze na koncentracije elementov

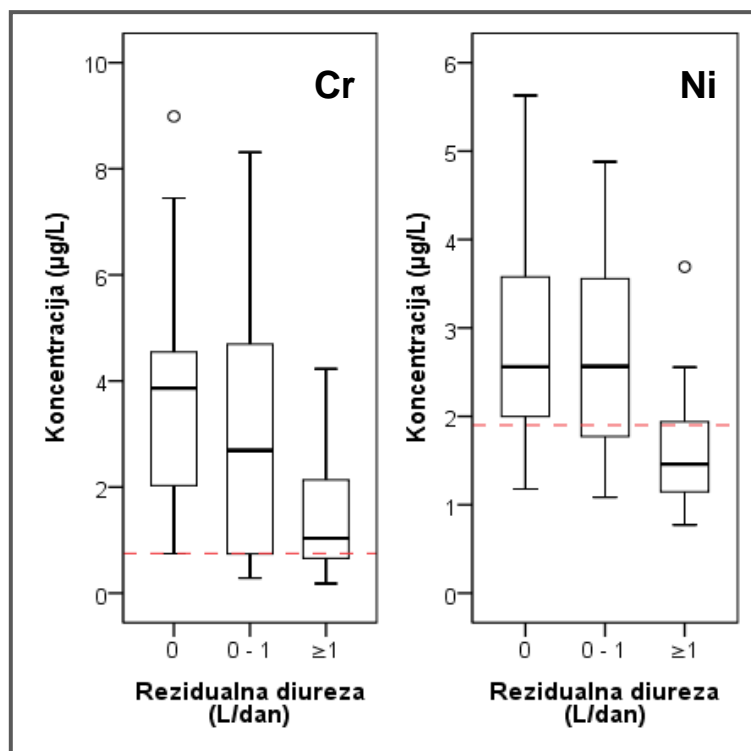
Rezidualna diureza je ocena rezidualne ledvične funkcije (6, 7, 8). Želeli smo ugotoviti ali imajo bolniki z večjo rezidualno diurezo nižje koncentracije elementov, ki se pretežno izločajo preko ledvic. Dializne bolnike smo razvrstili v 3 skupine glede na količino izločenega urina na dan (Preglednica XVI). V 1. skupino smo uvrstili bolnike brez rezidualne diureze, v 2. skupino bolnike s količino izločenega urina od 0,03 do 1 L/dan in v 3. skupino tiste s količino izločenega urina več kot 1 L/dan. S testom ANOVA smo preverili ali se koncentracije elementov razlikujejo med skupinami.

Preglednica XVI: Vpliv rezidualne diureze na koncentracije elementov

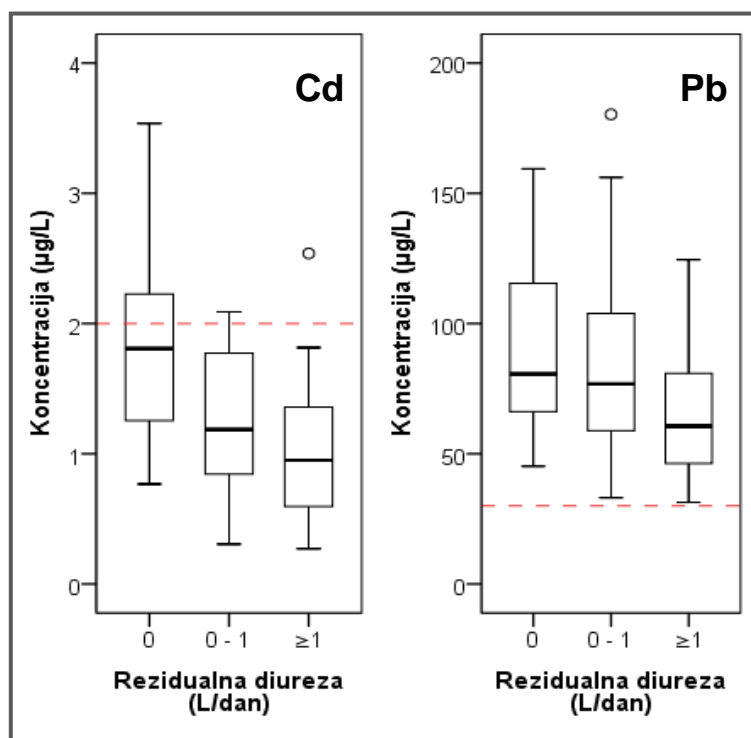
Skupina	Rezidualna diureza (L/dan)	Povprečna koncentracija Cr v plazmi (µg/L)	Povprečna koncentracija Ni v plazmi (µg/L)	Povprečna koncentracija Cd v krvi (µg/L)	Povprečna koncentracija Pb v krvi (µg/L)
1 (n = 30)	0	3,74	2,85	1,82	88,8
2 (n = 28)	0,03 - 1	2,98	2,64	1,21	84,7
3 (n = 21)	≥1	1,56	1,6	1,03	66,3

Ugotovili smo, da obstajajo statistično pomembne razlike med skupinami v plazemskih koncentracijah Cr ($p = 0,001$) in Ni ($p < 0,0005$), ter krvnih koncentracijah Cd ($p < 0,0005$) in Pb ($p = 0,033$). Pri ostalih elementih ni bilo statistično pomembnih razlik.

Pri Cr imajo bolniki iz 1. skupine statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 3. skupine ($p < 0,0005$), prav tako imajo bolniki iz 2. skupine statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 3. skupine ($p = 0,001$). Med 1. in 2. skupino ni statistično pomembnih razlik. Pri Ni imajo bolniki iz 1. skupine statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 3. skupine ($p < 0,0005$), ravno tako imajo bolniki iz 2. Skupine statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 3. skupine ($p = 0,016$). Med 1. in 2. skupino ni statistično pomembnih razlik. Rezultati so grafično prikazani na Sliki 14.



Slika 14: Primerjava koncentracij Cr in Ni v plazmi glede na rezidualno diurezo. Rdeča črta je zgornja referenčna meja (0,75 µg/L za Cr, 1,9 µg/L za Ni)



Slika 15: Primerjava koncentracij Cd in Pb v krvi glede na rezidualno diurezo. Rdeča črta je zgornja referenčna meja (2 µg/L za Cd, 30 µg/L za Pb)

Pri Cd imajo bolniki iz 1. skupine statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 2. in 3. skupine ($p < 0,0005$). Med 2. in 3. skupino ni statistično pomembnih razlik. Pri Pb

imajo bolniki iz 1. skupine statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 3. skupine ($p = 0,012$), bolniki iz 2. skupine pa imajo statistično pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 3. skupine ($p = 0,039$). Med 1. in 2. skupino ni statistično pomembnih razlik. Rezultati so grafično prikazani na Sliki 15.

Raziskav, kjer bi primerjali koncentracije elementov glede na rezidualno diurezo nismo našli, zato naših rezultatov ne moremo primerjati z ostalimi. Ugotovili smo, da imajo bolniki z večjo rezidualno diurezo nižje plazemske koncentracije Ni in Cr, ter nižje krvne koncentracije Cd in Pb. To so elementi, ki izločajo preko ledvic (14, 20). Pri bolnikih z večjo rezidualno ledvično funkcijo so koncentracije teh elementov nižje kot pri bolnikih z anurijo, kar kaže, da obstaja povezava med kopičenjem elementov in rezidualno ledvično funkcijo.

V razpravi smo pri omenjenih elementih predlagali, da je eden od vzrokov za zvišane koncentracije pri dializnih bolnikih ledvična okvara in zmanjšano izločanje elementa z urinom. Ugotovitev da obstaja povezava med koncentracijami teh elementov in rezidualno ledvično funkcijo naše domneve dodatno potrjuje.

4.4 Vpliv trajanja dializnega zdravljenja na koncentracije elementov

Želeli smo preveriti, ali trajanje dializnega zdravljenja vpliva na kopičenje oz. pomanjkanje elementov. Dializne bolnike smo glede na trajanje zdravljenja z dializo razvrstili v 5 skupin. V 1. skupino smo uvrstili bolnike, ki se z dializo zdravijo 12 mesecev ali manj, v 2. skupino bolnike, ki se zdravijo med 13 in 36 meseci, v 3. skupino tiste, ki se zdravijo med 37 in 60 meseci, v 4. skupino bolnike, ki se zdravijo med 61 in 120 meseci in v 5. skupino bolnike, ki se zdravijo več kot 120 mesecev (Preglednica XVII). Nato smo s testom ANOVA preverili, ali med skupinami obstajajo razlike v koncentracijah elementov. Do statistično pomembnih razlik je prišlo pri Cu v plazmi ($p = 0,02$), Pb v krvi ($p = 0,035$) in Hg v krvi ($p = 0,019$).

Ugotovili smo, da se plazemske koncentracije Cu statistično pomembno razlikujejo med skupinami. Bolniki iz 5. skupine imajo pomembno višje koncentracije kot bolniki iz 2. skupine ($p = 0,025$), 3. skupine ($p = 0,007$) in 4. skupine ($p = 0,004$).

V krvi smo opazili razlike pri Pb in Hg. Bolniki iz 1. skupine so imeli statistično pomembno nižje koncentracije Pb kot bolniki iz 2. skupine ($p = 0,004$), 4. skupine ($p = 0,013$) in 5. skupine ($p = 0,005$).

Preglednica XVII: Vpliv trajanja dializnega zdravljenja na koncentracije elementov

Skupina	Trajanje zdravljenja (meseči)	Povprečna koncentracija Cu v plazmi ($\mu\text{g/L}$)	Povprečna koncentracija Pb v krvi ($\mu\text{g/L}$)	Povprečna koncentracija Hg v krvi ($\mu\text{g/L}$)
1 (n = 11)	≤ 12	755,27	54,3	1,27
2 (n = 18)	13 - 36	728,15	88,66	0,58
3 (n = 13)	37 - 60	697,9	78,7	0,61
4 (n = 17)	61 - 120	698,76	83,93	0,49
5 (n = 21)	>120	815,34	87,54	0,86

Bolniki iz 1. skupine so imeli višje koncentracije Hg kot bolniki iz 2. skupine ($p = 0,007$), 3. skupine ($p = 0,014$) in 4. skupine ($p = 0,002$). Med 1. in 5. skupino ni bilo statistično pomembnih razlik.

Glede na rezultate domnevamo, da se Hg med dializo ne kopiči, ampak se celo učinkovito odstranjuje. Pb se med dializo kopiči, saj imajo bolniki, ki se dlje časa zdravijo z dializo višje koncentracije. Pri ostalih elementih v plazmi ali v krvi ni bilo pomembnih razlik.

Ostali raziskovalci so ugotovili, da je kopičenje Ni povezano s trajanjem dializnega zdravljenja, niso pa opazili povezave med trajanjem in koncentracijami Cu, Pb in Hg (43, 45). Mi povezave med zvišanimi koncentracijami Ni in trajanjem dializnega zdravljenja nismo našli.

4.5 Vpliv vrste dialize na koncentracije elementov

Preverili smo ali vrsta dializnega zdravljenja vpliva na koncentracije elementov v plazmi oz. v krvi. Bolniki na hemodiafiltraciji so v stiku z večjo količino dializne tekočine, zato smo predvidevali, da bodo imeli nižje koncentracije esencialnih elementov in višje koncentracije toksičnih elementov kot bolniki na hemodializi. S testom Shapiro-Wilk smo preverili normalnost porazdelitve koncentracij vseh elementov pri vsaki od skupin (HD, HDF). Koncentracije so bile porazdeljene normalno pri Cu in Se (plazma) in pri Mn (kri).

Pri teh vzorcih smo naredili t-test za dva neodvisna vzorca. Ugotovili smo, da pri nobenem od teh elementov ni bilo statistično pomembnih razlik med skupinama.

Preglednica XVIII: Primerjava koncentracij med hemodializo in hemodiafiltracijo

		Število preiskovancev	Mediana (µg/L)	Razpon koncentracij (µg/L)
Ni, plazma	Hemodializa	41	1,93	0,77 – 5,63
	Hemodiafiltracija	39	2,52	0,8 – 5,3
As, kri	Hemodializa	37	0,97	0,16 – 5,39
	Hemodiafiltracija	37	0,59	0,2 – 3,58

Pri ostalih vzorcih (Zn, Cr, Mo, Al, Ni v plazmi in As, Cd, Pb, Hg v krvi) smo naredili test Mann-Whitney U. Razlike med skupinama smo ugotovili le pri Ni v plazmi in As v krvi (Preglednica XVIII). Bolniki na hemodiafiltraciji so imeli statistično pomembno višje koncentracije Ni v plazmi kot bolniki na hemodializi ($p = 0,01$), pri As v krvi pa je bilo ravno nasprotno. Bolniki na hemodiafiltraciji so imeli pomembno nižje koncentracije As kot bolniki na hemodializi ($p = 0,014$).

Naši rezultati se razlikujejo od ugotovitev Prodanchuk in sodelavcev, da se koncentracije Ni in As med terapijama ne razlikujejo (11). Ugotovili so, da imajo bolniki na hemodializi višje koncentracije Cu, Cd in Pb kot bolniki na hemodiafiltraciji. Razlike med terapijama pripisujejo uporabi različnih hemodializatorjev pri vsaki od terapij (11).

5 SKLEPI

- Dializni bolniki so imeli v primerjavi s kontrolno skupino nižje plazemske koncentracije esencialnih elementov bakra (743,6 µg/L; 878,8 µg/L), cinka (634,7 µg/L; 769,1 µg/L) in selena (64,81 µg/L; 89,21 µg/L).
- Dializni bolniki so imeli v primerjavi s kontrolno skupino višje koncentracije esencialnih elementov kroma (2,2 µg/L; 0,28 µg/L) in molibdena (4,6 µg/L; 0,81 µg/L) v plazmi, ter mangana (9,38 µg/L; 7,65 µg/L) v krvi.
- Dializni bolniki so imeli primerjavi s kontrolno skupino višje koncentracije toksičnih elementov aluminija (2,83 µg/L; 1,73 µg/L) in niklja (2,06 µg/L; 0,33 µg/L) v plazmi ter kadmija (1,27 µg/L; 0,35 µg/L) in svinca (74,33 µg/L; 18,42 µg/L) v krvi.
- Koncentracije arzena v krvi se niso razlikovale med dializnimi bolniki in kontrolno skupino.
- Koncentracije živega srebra v krvi so bile pri dializnih bolnikih nižje kot pri kontrolni skupini (0,47 µg/L; 1,27 µg/L).
- Dializni bolniki z večjo rezidualno diurezo so imeli nižje koncentracije kroma in niklja v plazmi ter kadmija in svinca v krvi.
- Trajanje dializnega zdravljenja je povezano z višjimi koncentracijami svinca in nižjimi koncentracijami živega srebra v krvi.
- Bolniki, ki se zdravijo s hemodiafiltracijo so imeli višje koncentracije niklja v plazmi in nižje koncentracije arzena v krvi kot bolniki, ki se zdravijo s hemodializo.

Pri raziskavi nismo merili koncentracij elementov po končani dializi, prav tako nismo merili koncentracij v dializni tekočini pred in po dializi. Zato smo se pri interpretaciji rezultatov zanašali na rezultate drugih raziskovalcev, pri tem pa ni nujno, da so bile koncentracije elementov v njihovih dializnih tekočinah enake kot pri naših bolnikih. Če bi merili koncentracije v omenjenih vzorcih, bi verjetno dobili zelo jasno sliko, kako se obnašajo elementi pri dializnih bolnikih in v kolikšni meri je sama dializa odgovorna za spremenjene koncentracije. V prihodnje bi bilo smotno izmeriti koncentracije še v teh vzorcih, ob upoštevanju prehranskih navad in razvad.

6 LITERATURA

1. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations 6. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, 2009: 403-22.
2. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, Littera picta, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana: 2011.
3. Rupnik M: Fiziologija ledvic. Med Razgl 2005; 44: 235-56.
4. Hribernik M: Anatomija ledvic. Med Razgl 2005; 44: 223-7.
5. Lindič J: Bolezni ledvic, 3. izdaja. Slovensko zdravniško društvo, Slovensko nefrološko društvo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, 2014.
6. Ponikvar R, Buturovič-Ponikvar J: Dializno zdravljenje, Klinični oddelek za nefrologijo, Ljubljana, 2004.
7. Dawenport A: Will Incremental Hemodialysis Preserve Residual Function and Improve Patient Survival? Semin Dial 2015; 28(1):16-9.
8. Nechita AM, et al: Determining factors of diuresis in chronic kidney disease patients initiating hemodialysis. Journal of Medicine and Life 2015;3: 371-7.
9. Ledebor I, Blankestijn PJ: Haemodiafiltration—optimal efficiency and safety. NDT Plus 2010; 3: 8-16.
10. Mactier D, Hoenich N, Breen C: Renal Association Guidelines - Hemodialysis, Renal Association, 2009.
11. Prodanchuk M, Makarov O, Pisarev E, et al.: Disturbances of trace element metabolism in ESRD patients receiving hemodialysis and hemodiafiltration. Cent Eur J Urol 2013; 66: 472-476.
12. Tong MK, Wang W, Kwan TH, Chan L, Au TC: Water treatment for hemodialysis. Hong Kong J Nephrol 2001; 3: 7-14.
13. Černe K. Toksikologija (težkih) kovin. Med Razgl 2009; 48: 83-100.

14. Shenkin A, Roberts NB: Vitamins and Trace Elements v Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 5. izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2012.
15. Gropper SS, Smith JL: Advanced nutrition and human metabolism, 6. izdaja, Cengage Learning, Wadsworth, 2013: 481-559.
16. Fong T, Vij R, Vijayan A, DiPersio J, Blinder M: Copper deficiency: an important consideration in the differential diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2007; 92: 1429-30.
17. Huff JD, et al: Copper Deficiency Causes Reversible Myelodysplasia. *American Journal of Hematology* 2007; 82: 625-30.
18. Jaiser SR, Winston GP: Copper deficiency myelopathy. *J Neurol* 2010; 257: 869–81.
19. Klevay LM: Cardiovascular Disease from Copper Deficiency—A History. *J Nutr* 2000; 130: 489-92.
20. Moyer TP: Toxic metals v Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 5. izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2012.
21. Tonelli M, et al: Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* 2009; 7(25).
22. Prasad AS: Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 63-9.
23. Gallieni M, Brancaccio D, Cozzolino M, Sabbioni E: Trace elements in renal failure: are they clinically important? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1232-35.
24. Chimienti F: Zinc, pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story. *Nutrition Research Reviews* 2013; 26: 1-11.
25. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Chromium, 2012.
26. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012, 100C.
27. Vincent JB: The Biochemistry of Chromium. *J Nutr* 2000; 130: 715-8.

28. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Manganese, 2012.
29. Walravens PA, Moure-Eraso R, Solomons CC, Chappell WR, Bentley G: Biochemical abnormalities in workers exposed to molybdenum dust. Arch Environ Health 1979; 34: 302-8.
30. Vyskocil A, Viau C: Assessment of molybdenum toxicity in humans. J Appl Toxicol 1999; 19: 85-92.
31. Filler G, Felder S: Trace elements in dialysis. Pediatr Nephrol 2014; 29: 1329-35.
32. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances And Disease Registry: Toxicological Profile for Aluminum, 2008.
33. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Arsenic, 2007.
34. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances And Disease Registry: Toxicological Profile for Cadmium, 2012.
35. Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M: Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. Scand J Work Environ Health 1998; 24: 1-51.
36. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances And Disease Registry: Toxicological Profile for Nickel, 2005.
37. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Lead, 2007.
38. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances And Disease Registry: Toxicological Profile for Mercury, 1999.
39. Agilent Technologies: Agilent 7700 Series ICP-MS Hardware Manual, Agilent Technologies, Tokyo, 2010.
40. Thomas R: A Beginner's Guide to ICP-MS. Spectroscopy 2001; 16.

41. Rockwood AL, Annesley TM, Sherman NE: Mass Spectrometry v Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Elsevier Saunders, St. Louis, 2012.
42. Van Renterghem D, Cornelis R, Vanholder R: Behaviour of 12 trace elements in serum of uremic patients on hemodiafiltration. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1992; 6(3): 169-74.
43. Hsieh Y, et al: Long-Term Changes in Trace Elements in Patients Undergoing Chronic Hemodialysis. *Biological Trace Element Research* 2006; 109: 115-21.
44. El-Habibi EM, Bakr MA, Kamal N: Impact of Haemodialysis on Certain Trace Elements Among Patients Suffering from End Stage Renal Disease. *Journal of American Science* 2012; 8(12): 827-33.
45. Gomez de Ona C, et al.: Variation of trace element concentrations in patients undergoing hemodialysis in the north of Spain. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2016; 76: 492-99.
46. Vanholder R, Cornelis R, Dhondt A, Lameire N: The Role of Trace Elements in Uraemic Toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2-8.
47. Chaignon M, Chen WT, Tarazi RC, Bravo EL, Nakamoto S: Effect of Hemodialysis on Blood Volume Distribution and Cardiac Output. *Hypertension* 1981; 3: 327-32.
48. Bento I, Peixoto C, Zaitsev VN, Lindley PF: Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Cryst* 2007; 63: 240-48.
49. Khalaj AR, Sanavi S, Rajabi MR: Effect of Intradialytic Change in Plasma Volume on Blood Pressure in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *J Lab Physicians* 2010; 2: 66-9.
50. Szpanowska-Wohn A, Kolarzyk E, Chowaniec E: Estimation of intake of zinc, copper and iron in the diet of patients with chronic renal failure treated by haemodialysis. *Biol Trace Elem Res* 2008; 124: 97-102.
51. Xiang S, Yao Y, Wan Y, et al.: Comparative Study on Trace Element Excretions between Nonanuric and Anuric Patients Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Nutrients* 2016; 8: 826-41.

52. Higuchi T, Matsukawa Y, Okada K, et al.: Correction of copper deficiency improves erythropoietin unresponsiveness in hemodialysis patients with anemia. *Intern Med* 2006; 45: 271-3.
53. Bossola M, Di Stasio E, Viola A, et al.: Dietary intake of trace elements, minerals, and vitamins of patients on chronic hemodialysis. *Int Urol Nephrol* 2014; 46: 809-15.
54. Stark S, Snetselaar L, Hall B, et al.: Nutritional Intake in Adult Hemodialysis Patients. *Top Clin Nutr* 2011; 26: 45-56.
55. Bonforte G, Surian M, Dozio B, et al.: Plasma or whole blood concentrations of trace elements in patients treated by haemodiafiltration with on-line prepared substitution fluid. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 29-33.
56. Yang CY, et al.: Essential trace element status and clinical outcomes in long-term dialysis patients: A two-year prospective observational cohort study. *Clinical Nutrition* 2012; 31: 630-36.
57. D'Haese PC, De Broe ME: Adequacy of dialysis: trace elements in dialysis fluids. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 92-7.
58. Lokesh S, et al.: Trace Elements in Chronic Haemodialysis Patients and Healthy Individuals-A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016; 10: 14-17.
59. D'Haese PC, Couttenye MM, Lamberts LV, et al.: Aluminum, Iron, Lead, Cadmium, Copper, Zinc, Chromium, Magnesium, Strontium and Calcium Content in Bone of End-Stage Renal Failure Patients. *Clin Chem* 1999;. 45: 1548-56.
60. European Commission Joint Research Centre. European Union Risk Assessment Report: Chromium Trioxide, Sodium Chromate, Sodium Dichromate, Ammonium Dichromate and Potassium Dichromate, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2005.
61. Da Silva CJ, Da Rocha AJ, Jeronymo S, et al.: A preliminary study revealing a new association in patients undergoing maintenance hemodialysis: manganese symptoms and T1 hyperintense changes in the basal ganglia. *Am J Neuroradiol* 2007; 28: 1474-9.

62. European Pharmacopoeia 7. izdaja, Council of Europe, Strassbourg, 2011: 2135-6.
63. Ohtake T, Negishi K, Okamoto K, et al.: Manganese-induced Parkinsonism in a patient undergoing maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 749-53.
64. Hosokawa S, Yoshida O: Clinical studies on molybdenum in patients requiring long-term hemodialysis. *ASAIO Journal* 1994; 40(3): 445-9.
65. Scientific Committee on Food: Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Molybdenum. 2000.
66. Fujishima Y, et al.: Serum selenium levels are inversely associated with death risk among hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3331-8.
67. Makhloogh A, Shokrzadeh M, Shaliji M, Abedi S: Comparative Analysis of Serum Levels of Aluminum and Lead in Dialysis Patients, Pre and post Dialysis. *Res Mol Med* 2014; 2: 45-9.
68. Silambanan S, Manikandan A, Palaneeswari S, Soundararajan P: Aluminium Toxicity in Chronic Kidney Disease Patients on Maintenance Hemodialysis. *International Journal of Scientific Research* 2015; 6: 370-2.
69. National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42.
70. Jaffe JA, Liftman C, Glickman JD: Frequency of elevated serum aluminum levels in adult dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 316-9.
71. Ryan TP, McElwain LL, Murphy TD: Elevated Serum Aluminum Levels in Hemodialysis Patients Associated with Use of Electric Pumps. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2008; 57: 689-91.
72. Mardini J, Lavergne V, Ghannoum M: Aluminum transfer during dialysis: a systematic review. *Int Urol Nephrol* 2014; 46: 1361-5.
73. Wills MR, Savory J: Water Content of Aluminum, Dialysis Dementia, and Osteomalacia. *Environmental Health Perspectives* 1985; 63: 141-7.

74. Bia MJ, Cooper K, Schnall S, et al.: Aluminum induced anemia: pathogenesis and treatment in patients on chronic hemodialysis. *Kidney Int* 1989; 36: 852-8.
75. Palaneeswari S, et al.: Blood Arsenic and Cadmium Concentrations in End-Stage Renal Disease Patients who were on Maintenance Haemodialysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013; 7(5): 809-13.
76. Zhang X, Cornelis R, De Kimpe J, et al.: Accumulation of arsenic species in serum of patients with chronic renal disease. *Clin Chem* 1996; 42: 1231-7.
77. Singh AP, Goel RK, Kaur T: Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicol Int* 2011; 18: 87-93.
78. Hsu CW, Lin JL, Lin-Tan DT, et al.: Association of environmental cadmium exposure with inflammation and malnutrition in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1282-88.
79. Długaszek M, Karbowiak P, Szopa M: Comparative analysis of trace elements concentrations in dialysis fluids before and after dialyzer. *J Elementol* 2009; 14(1): 43-5.
80. Drazniowsky M, Parkinson IS, Ward MK, Channon SM, Kerr DN: Raised serum nickel concentrations in chronic renal failure. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc* 1985; 21: 241-6.
81. Webster JD: Acute Nickel Intoxication by Dialysis. *Ann Intern Med* 1980; 92(5): 631-3.
82. Palaneeswari S, et al: Blood Lead in End-Stage Renal Disease (ESRD) Patients who were on Maintenance Haemodialysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2012; 6(10): 1633-5.
83. Martegani M, Gobba Fabrizio, Frattini G, et al.: Does Lead Overload Develop in Hemodialysis Patients? *Nephron* 1989; 51: 420-1.
84. Lin JL, et al: Association of Blood Lead Levels With Mortality in Patients on Maintenance Hemodialysis. *American Journal of Medicine* 2011; 124: 350-8.