

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

AJLA HAJRLAHOVIĆ

**DOLOČANJE REFERENČNIH VREDNOSTI ESENCIALNIH ELEMENTOV V
SLEDOVIH, IZMERJENIH V KRVNI PLAZMI Z METODO MASNE
SPEKTROMETRIJE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

AJLA HAJRLAHOVIĆ

**DOLOČANJE REFERENČNIH VREDNOSTI ESENCIALNIH ELEMENTOV V
SLEDOVIH, IZMERJENIH V KRVNI PLAZMI Z METODO MASNE
SPEKTROMETRIJE**

**DETERMINATION OF REFERENCE INTERVALS FOR ESSENTIAL TRACE
ELEMENTS MEASURED IN BLOOD PLASMA BY MASS SPECTROMETRY**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Milana Skitka. Eksperimentalni del magistrske naloge je bil opravljen na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Laboratoriju za določanje encimov in elementov v sledovih; Njegoševa 4, Ljubljana.

Zahvala

Zahvaljujem se somentorici asist. mag. Alenki France-Štiglic in mentorjuizr. prof. dr. Milanu Skitku za njuno strokovno svetovanje in usmerjanje skozi celoten proces. Hvala jima za ponujeno priložnost, izkazano zaupanje, potrpežljivost in skrbnost pri nastajanju naloge.

Rada bi se zahvalila tudi celotnemu kolektivu Laboratorija za določanje encimov in elementov v sledovih, da so me sprejeli medse. Posebej hvala vodji mag. Alenki Sešek Briški za prijaznost in spodbudi ter Heleni Miklavc, ki mi je s praktičnimi nasveti vseskozi pomagala pri eksperimentalnem delu naloge.

Zahvaljujem se osebju Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino in vsem krvodajalcem.

Ajda Trdin – hvala!

Posebna in največja hvala pa vsekakor mojim staršem. Mojemu Ismetu in moji Semiri, ki sta bila in vedno bosta moj temelj vsega. Starim staršem, mojima Mustafi in Smajilu, ki sta mi dala veliko več kot vesta sama. In mojemu Harisu, ki je moj vsakodnevni učitelj.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Milana Skitka in somentorice asist. mag. Alenke France-Štiglic.

Ljubljana, 2018

Ajla Hajrlahović

Predsednica magistrske komisije:izr. prof. dr. Mojca Kerec - Kos

Članica magistrske komisije: doc. dr. Urša Pečar Fonović

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|------|
| Kazalo vsebine..... | III |
| Kazalo slik..... | V |
| Kazalo preglednic..... | VI |
| Povzetek..... | VII |
| Abstract..... | VIII |
| Seznam okrajšav..... | IX |
| 1 Uvod..... | 1 |
| 1.1 Esencialni elementi v sledovih..... | 3 |
| 1.1.1 Baker..... | 4 |
| 1.1.2 Cink..... | 5 |
| 1.1.3 Kobalt..... | 6 |
| 1.1.4 Krom..... | 7 |
| 1.1.5 Mangan..... | 8 |
| 1.1.6 Molibden..... | 9 |
| 1.1.7 Selen..... | 9 |
| 1.2 Metode določanja elementov v sledovih..... | 11 |
| 1.2.1 Masna spektrometrija..... | 12 |
| 1.2.1.1. Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS)..... | 12 |
| 1.3 Referenčno območje..... | 15 |
| 1.3.1 Smernice CLSI..... | 16 |
| 1.3.1.1 Protokol postavljanja referenčnih vrednosti..... | 17 |
| 2 Namen dela..... | 20 |
| 3 Materiali in metode..... | 21 |
| 3.1 Preiskovanci..... | 21 |
| 3.2 Vzorci..... | 22 |
| 3.3 Delovno okolje, oprema in laboratorijski pribor..... | 22 |
| 3.4 Kemikalije, standardi in kontrolni material..... | 23 |
| 3.4.1 Priprava sistemskih tekočin..... | 24 |
| 3.4.2 Priprava standardnih kalibracijskih raztopin in kontrolnega..... | 25 |
| 3.5 Merjenje analitov..... | 27 |
| 3.6 Statistična analiza..... | 28 |

| | | |
|-----|-------------------------|----|
| 4 | Rezultati..... | 29 |
| 5 | Razprava..... | 35 |
| 5.1 | Baker..... | 37 |
| 5.2 | Cink..... | 39 |
| 5.3 | Kobalt..... | 40 |
| 5.4 | Krom..... | 42 |
| 5.5 | Mangan..... | 43 |
| 5.6 | Molibden..... | 44 |
| 5.7 | Selen..... | 45 |
| 6 | Sklepi..... | 48 |
| 7 | Literatura in viri..... | 49 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Shematski prikaz analizatorja ICP-MS (24)..... | 14 |
| Slika 2: Odnosi med definiranimi izrazi (27)..... | 18 |
| Slika 3: Izbira posameznikov za določanje referenčnega območja (25)..... | 19 |
| Slika 4: Razporeditev referenčnih posameznikov v dekada..... | 21 |
| Slika 5: Graf porazdelitve podatkov za Cu..... | 30 |
| Slika 6: Graf porazdelitve podatkov za Zn..... | 30 |
| Slika 7: Graf porazdelitve podatkov za Co..... | 31 |
| Slika 8: Graf porazdelitve podatkov za Cr..... | 31 |
| Slika 9: Graf porazdelitve podatkov za Mn..... | 32 |
| Slika 10: Graf porazdelitve podatkov za Mo..... | 32 |
| Slika 11: Graf porazdelitve podatkov za Se..... | 33 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica I: Priprava standardnih kalibracijskih raztopin..... | 26 |
| Preglednica II: Referenčna območja esencialnih elementov v sledovih..... | 34 |
| Preglednica III: Primerjava referenčnih območij določenih z ICP-MS metodo med odraslo slovensko in nekaterimi svetovnimi populacijami..... | 36 |

POVZETEK

V Laboratoriju za določanje encimov in elementov v sledovih, ljubljanskega Kliničnega oddelka za klinično kemijo in biokemijo, je v uporabo stopila nova metodologija določanja elementov v sledovih. Induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo (ICP-MS) se je v dosedanjih objavah pokazala za zanesljivo, natančno, točno in hitro metodo za določanje elementov v sledovih v vzorcih krvi in njenih pripravkov. Ob uporabi nove metode, je bilo potrebno postaviti tudi nova referenčna območja.

Referenčne meje služijo kot osnova za vrednotenje izmerjenih vrednosti elementov v sledovih po okoljski ali poklicni izpostavljenosti ter v primeru bolezni, terapij ali fizioloških sprememb. Zanesljivost referenčnih intervalov je odvisna predvsem od preišljene izbire posameznikov, primerne ravnanja z vzorci in nadzora nad pred-analitičnimi in analitičnimi dejavniki.

Namen magistrskega dela je bila postavitve referenčnih območij v vzorcih krvne plazme z ICP-MS za esencialne elemente v sledovih: baker, cink, kobalt, krom, mangan, molibden in selen. Dobljene vrednosti, ki veljajo za odraslo slovensko populacijo, smo primerjali z ostalimi svetovnimi populacijami. Ugotovili smo, da na razlike v referenčnih območjih vplivajo dejavniki kot so geografska lega, spol, prehranjevanje in drugi.

Rezultati naših meritev v krvni plazmi so: 586-1730 $\mu\text{g/L}$ za baker; 610-1434 $\mu\text{g/L}$ za cink; $< 0,65 \mu\text{g/L}$ za kobalt, $< 0,75 \mu\text{g/L}$ za krom; $< 1,1 \mu\text{g/L}$ za mangan; 0,46-2,1 $\mu\text{g/L}$ za molibden in 60,5-115,6 $\mu\text{g/L}$ za selen.

KLJUČNE BESEDE

Esencialni elementi v sledovih, referenčno območje, masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo.

ABSTRACT

A new methodology for trace elements determination in the Laboratory for Enzyme and Trace Element Determination at the Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry of University Medical Centre Ljubljana was used. Inductively coupled plasma mass spectrometry methodology (ICP-MS) appears to be a reliable, accurate and a quick way to determine trace element concentrations in human blood and its components. As the new method entered into use, new reference intervals were necessary.

Reference limits serve as a base when one needs to value the impact of trace elements on human health and body after environmental or occupational exposure and also in case of disease, therapy and physiological changes. The reliability of reference intervals depends mainly on the chosen reference population, sample preparation and pre-analytic as well as analytic variables.

The purpose of this Master's degree study was the establishment of reference intervals in blood plasma with ICP-MS for essential trace elements: copper, zinc, cobalt, chromium, manganese, molybdenum and selenium. Our results were compared with some of the other worldwide populations. We conclude the differences in reference intervals are influenced by many different factors such as geographic area, sex, nourishment and others.

Our findings are: 586-1730 µg/L for copper; 610-1434 µg/L for zinc; < 0,65 µg/L for cobalt; < 0,75 µg/L for chromium; < 1,1 µg/L for manganese; 0,46-2,1 µg/L for molybdenum and 60,5-115,6 µg/L for selenium.

KEY WORDS

Essential trace elements, reference values, inductively coupled plasma mass spectrometry.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|---------------|--|
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute – Inštitut za klinične in laboratorijske standarde |
| ICP-MS | masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo |
| IFCC | International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine – Mednarodna federacija za klinično kemijo in laboratorijsko medicino |
| AES | atomska emisijska spektroskopija |
| FAAS | plamenska atomska absorpcijska spektrometrija |
| ET-AAS | elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija |
| NAA | nevtronska aktivacijska analiza |

1 UVOD

Ko zdravnik diagnoze ne more postaviti zgolj na podlagi kliničnih znakov oz. ko želi potrditev diagnoze, pomembno vlogo odigra klinični laboratorij. Laboratorijski rezultati namreč vplivajo na 60-70% zdravnikovih odločitev. Zagotavljanje kakovosti pri delu medicinskega laboratorija je zato ključnega pomena, saj se ta kaže v kasnejši obravnavi in zdravljenju bolnika ter s tem povezanimi stroški. Nekateri laboratorijski testi zdravstvenemu osebjemu podajo jasen »da« ali »ne« odgovor, medtem ko je rezultat nekaterih številka oz. posamezna vrednost. Le-ta, sama po sebi, ne pomeni ničesar, če je ne primerjamo z referenčnim območjem. Interpretacija laboratorijskih meritev bolnikovega vzorca je primerjalni proces, pri katerem klinični rezultate laboratorijskih preiskav primerja z referenčnim območjem. Zanesljivi referenčni intervali so zato nujno potrebni za številne laboratorijske teste. Njihovo dostopnost in zanesljivost zagotavljajo posamezni klinični laboratoriji v sodelovanju s proizvajalci diagnostičnih testov (1, 2).

Referenčne vrednosti za posamezno laboratorijsko preiskavo so zato določene na znanstven in sistematičen način, saj le tako lahko z gotovostjo trdimo, da bodo rezultati preiskav zanesljivi. V ta namen je Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) izdal dokument s smernicami in sistematičnimi postopki za postavljanje referenčnih vrednosti in referenčnih območij za kvantitativne laboratorijske teste. Priporočila CLSI so namenjena postavitvi standardnega protokola za določanje referenčnih intervalov, ki dosegajo minimalne vendar obvezne pogoje za zanesljivost.

Razumevanje celotnega procesa postavljanja referenčnih intervalov nam da boljši vpogled v omejitve le-teh. Na postavljanje referenčnih vrednosti vplivajo pred-analitične in analitične spremenljivke, ki morajo biti skozi celoten proces dokumentirane in upoštevane (1, 3).

Elementi v sledovih so anorganske snovi, potrebne vsem živim organizmom. V organizmu se nahajajo v koncentracijah, nižjih od 100 µg/g telesne teže. Potrebni so pri številnih presnovnih procesih, rasti organizma, razvoju in razmnoževanju. Zelo majhna količina posameznega elementa v telesu lahko vpliva na stanje celotnega organizma. Izraz elementi v sledovih (angl. trace elements) so prvotno uporabljali za vse elemente, ki jih s takratnimi tehnikami ni bilo mogoče kvantitativno določiti.

Danes nam bolj napredne in občutljive metode omogočajo natančno določitev elementov v sledovih v bioloških vzorcih kot so kri, krvni pripravki, urin, lasje, nohti in različna tkiva (4, 5).

Prisotnost in koncentracija elementov v sledovih v našem organizmu sta odvisni od okolja v katerem živimo, saj se le-ti pojavljajo v zemlji, zraku in vodi. Koncentracija teh elementov v telesu je odvisna tudi od hrane, ki jo uživamo. Absorbirajo se počasi, kljub nizkim koncentracijam pa v telesu igrajo pomembno vlogo. Pomembno je vedeti, da z merjenjem elementov v sledovih ocenimo zgolj trenutno stanje v telesu. Za ugotavljanje pomanjkanja ali toksičnosti zato uporabljamo različne biološke kazalce, ki nam dajo vpogled v daljše časovno obdobje.

V literaturi obstajajo različne delitve elementov v sledovih, kljub temu pa jih lahko razdelimo v tri večje skupine: esencialne, verjetno esencialne in neesencialne oziroma potencialno toksične.

Esencialni elementi so tisti, ki sodelujejo pri življenjsko pomembnih procesih, razvoju, rasti in razmnoževanju. Ob njihovem pomanjkanju pride do resnih težav, bolezni ali celo smrti, njihovega učinka pa ne moremo v celoti nadomestiti z drugim elementom. Pomembna je optimalna količina esencialnih elementov v telesu. Esencialni elementi v sledovih so baker, cink, selen in drugi.

Verjetno esencialni elementi so tisti pri katerih so bili opaženi znaki pomanjkanja, vendar še danes ne vemo natančno, kakšna je njihova biokemijska vloga. Zaradi študij na živalih, lahko za nekatere elemente sklepamo, da so potencialno esencialni za človeka. Potencialno esencialni elementi so brom, stroncij, vanadij, kositer in številni drugi.

Nadaljnja delitev elementov v sledovih na neesencialne oziroma toksične elemente, je upravičena zgolj za nekaj elementov kot so svinec, živo srebro in kadmij. Toksični vplivi teh elementov se namreč lahko izrazijo že v zelo nizkih koncentracijah. Tudi za esencialne elemente velja, da lahko njihove prekomerne koncentracije povzročijo toksične učinke (6, 7).

1.1 Esencialni elementi v sledovih

Esencialnost določenega elementa najbolj nakazuje fiziološke posledice njegovega pomanjkanja ali prekomerne koncentracije. To so elementi, ki sodelujejo pri glavnih življenjskih procesih. Esencialni elementi so sestavni deli encimov ali njihovi aktivatorji in so kot taki zelo pomembni v presnovnih procesih. Delovanja posameznega esencialnega elementa ni mogoče popolnoma nadomestiti z drugim elementom. Pomanjkanje esencialnih elementov v sledovih je posledica nezadostnega vnosa s hrano, boleznimi ali porušenega ravnovesja. Njihovo pomanjkanje se kaže v funkcijskih in strukturnih spremembah organizma. Bolezenskih znakov, ki se pojavijo ob nezadostnem vnosu ali pomanjkanju, se lahko znebimo z zadostno (ponovno) aplikacijo določenega esencialnega elementa. Kljub temu, da so esencialni elementi nujno potrebni za delovanje organizma, pa lahko njihove previsoke koncentracije privedejo do toksičnih učinkov. Elementom v sledovih smo izpostavljeni preko hrane, pijače, zraka in okolja v katerem živimo. (4, 5, 8). Med esencialne elemente v sledovih uvrščamo baker (Cu), cink (Zn), kobalt (Co), krom (Cr), mangan (Mn), molibden (Mo) in selen (Se). Vseh sedem je podrobneje opisanih v nadaljevanju.

1.1.1 Baker

Baker (Cu) je pogosta kovina, ki jo najdemo v hrani, pitni vodi in zraku.

Ker je kofaktor številnih encimov, je potreben za rast in normalen metabolizem. Sodeluje pri prenosu kisika (4).

Vsebnost Cu v hrani je odvisna od škropljenja poljščin z gnojili, ki so bogata s Cu ter tudi od uporabe bakrenih posod pri kuhanju. Živila z veliko Cu so predvsem jetra in ledvice; veliko ga je tudi v oreščkih, školjkah in polnozrnatih izdelkih (9). Koncentracija Cu v zraku je v mestih višja kot na podeželju; koncentracije v pitni vodi z različnih področij se zelo razlikujejo in so odvisne od pH in trdote vode ter materiala iz katerega so izdelane pipe in vodovodne cevi (10).

Cu se absorbira v dvanajstniku in zgornjem delu tankega črevesa, v manjšem obsegu tudi v želodcu (4). Preko žolča ga izločamo z blatom, v manjših količinah z urinom in potem (4, 7, 9). V telesu je od 100 do 150 mg Cu. Njegova absorpcija je v največji meri odvisna od kemijske oblike Cu, ki se nahaja v hrani ter od prisotnosti njegovih antagonistov – cinka, kadmija in molibdena (10).

Čeprav se dve tretjini telesnega Cu nahaja v kosteh in mišicah, so jetra tisti organ, ki skrbi za njegovo homeostazo. Skladišči se tudi v srcu, možganih in ledvicah (9, 10).

V krvi se Cu približno enakomerno razporedi med eritrocite in krvno plazmo. V rdečih krvničkah se Cu veže na encim superoksid dismutaza, katerega osnovna naloga je varovanje celic pred prostimi radikali. Od 90 do 95% plazemskega Cu je vezanega na metaloprotein ceruloplazmin. Okoli 5% Cu v plazmi se veže na albumin in ostale peptidne komplekse; nekaj malega po krvi kroži v ionizirani obliki (10). Koncentracija Cu v plazmi ali serumu pri zdravem človeku se zaradi drugačnega cirkadianega ritma ali prehrane, bistveno ne spremeni (8).

Pri pomanjkanju Cu lahko pride do hipokromne anemije, nevroloških motenj in nevtropenije. Do pomanjkanja pride pri ljudeh z redkimi prirojenimi boleznimi (Menkejev sindrom).

Toksični učinki Cu se kažejo kot hemolitična anemija, nekroza jetrnega tkiva in poškodba ledvic. Toksičnost Cu je zelo izražena pri Wilsonovi bolezni. To je stanje, ko se Cu kopiči v organizmu in povzroča predvsem okvare jeter (4, 5).

V klinični praksi za ugotavljanje statusa Cu merimo serumski Cu in ceruloplazmina ter Cu v urinu (4).

1.1.2 Cink

Cink (Zn) se kot strukturni del molekule nahaja v več kot 200 encimih in ima pomembno vlogo predvsem pri sintezi nukleinskih kislin, tvorbi kolagena, reprodukciji, eritropoezi in metabolizmu holesterola. Največ Zn v telo vnesemo s hrano in vodo, v minimalnih koncentracijah celo skozi kožo in pljuča. (4, 11). Zn je v naravi zelo razširjen. Njegova koncentracija v zemlji zelo variira in je najvišja v urbanih področjih, predvsem blizu velikih deponij, odvisna pa je tudi od vremena. Najvišje koncentracije Zn in nekaterih toksičnih elementov so izmerili na območjih s težko industrijo (9, 12).

Zn je prisoten predvsem v hrani z visoko vsebnostjo beljakovin, torej v ribah in rdečem mesu. Veliko ga je tudi v pšenici in drugih žitih, vendar pa je njegova vsebnost v teh živilih zaradi predelave včasih lahko močno znižana (8, 9).

Absorbira se v tankem črevesu in je najbolj koncentriran znotrajcelični element v sledovih, saj se v obliki kompleksov s proteini nahaja v skoraj vseh organih. V telesu odraslega človeka je od 2 do 2,5 g Zn. Prisoten je v vseh metabolno aktivnih celicah, okoli 55% ga je v mišicah in približno 30% v kosteh (9).

Absorbirani Zn se v krvi razporedi med eritrocite (75-88%), plazmo (12-22%) in levkocite (3%). Večina Zn v polni krvi se nahaja v eritrocitnih membranah pa tudi kot komponenta metaloencima karbonska anhidraza. Plazemski Zn je vezan na albumine in globuline – predvsem na metaloprotein α_2 -makroglobulin (10). Zaradi visokih količin karbonske anhidraze je koncentracija tega elementa v polni krvi tudi do desetkrat višja od plazemske (9).

Bolj kot toksičnosti, smo izpostavljeni pomanjkanju Zn. Najpogostejši vzrok pomanjkanja je pomanjkljiva prehrana, pomankanje pa je lahko posledica nekaterih bolezni in terapije z anaboliki. Simptomi pomanjkanja Zn so nespecifični in odvisni od trajanja pomanjkanja. Osebe z malo Zn so zaradi oslabiljenega imunskega sistema bolj izpostavljene infekcijam (4, 5, 11, 13).

Zvišane koncentracije Zn v organizmu v prvi vrsti povzročijo zmanjšanje zalog Cu zaradi česar je nato motena sinteza hema. Posledično pride do anemije (5, 11).

Zn določamo v plazmi, njegovo pomanjkanje pa lahko indirektno določimo z merjenjem aktivnosti alkalne fosfataze (5, 7).

1.1.3 Kobalt

Kobalt (Co) je ključna sestavina kobalamina (vitamina B₁₂), ki je nujno potreben pri procesu eritropoeze. Ta esencialni element sodeluje tudi pri reakcijah imunskega odziva, aktivira delovanje različnih encimov, sodeluje tudi pri sintezi nukleinskih kislin in ščitničnih hormonov (4). Co je relativno redek element Zemljine skorje. Visoke koncentracije Co v zemlji so predvsem posledica gnojenja s fosfatnimi gnojili. Njegove koncentracije v zraku so, pričakovano, povišane ob industrijskih območjih in v velikih mestih (12). Co se v obliki vitamina B₁₂ nahaja izključno v hrani živalskega izvora (meso, mleko, ribe, jajca) zato je njegova koncentracija v organizmu odvisna od uživanja tovrstnih živil. Vir Co v obliki kobalamina predstavljajo različna prehranska dopolnila (14).

V organizmu imamo približno 1,1 mg Co, od tega je 85% v obliki vitamina B₁₂. Po absorpciji se Co porazdeli po različnih tkivih, vendar pa se ne akumulira v nobenem organu. Hitro ga izločimo z urinom (12).

V eritrocitih je od 1,5- do 2-krat več Co kot v krvni plazmi. 99% Co v plazmi je vezanega na proteine: od 40 do 45% na α_2 -makroglobulin, ostalo na serumski albumin, ki je tudi glavna transportna oblika Co. Plazemski vitamin B₁₂ se prenaša vezan na transkobalamin (10).

Naš organizem sprejme relativno visoke koncentracije Co, zato do toksičnih učinkov velikokrat sploh ne pride. Kljub temu lahko uživanje visokih koncentracij Co povzroči bruhanje, težave z vidom in ščitnico ter vrtoglavico (5, 11).

Serumske koncentracije Co so nizke, najpogosteje ga določamo v polni krvi in urinu (4, 5).

1.1.4 Krom

Esencialnost kroma (Cr) določa predvsem njegova vloga pri presnovi ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob. Esencialen je pri metabolizmu glukoze (5).

V naravi se Cr nahaja v obliki ionov Cr^{6+} in Cr^{3+} , njegova razširjena uporaba v industriji pa je povzročila, da se po vsem svetu nahaja predvsem v zraku in zemlji. Koncentracije Cr v hrani so relativno nizke (10). Vir Cr predstavljajo meso, polnozrnat izdelki, zelena zelenjava in nekatere začimbe. Količine Cr v živilih so lahko zelo različne. Le-te so namreč odvisne od procesiranja živil, njihovega shranjevanja in priprave (9).

Absorpcijo Cr v gastrointestinalnem traktu pospešuje askorbinska kislina, zavirajo pa jo fitati. Izločamo ga z urinom (4). Cr iz krvnega obtoka hitro preide v tkiva kot so jetra, vranica in kosti, daleč najvišje koncentracije Cr pa najdemo v pljučih (15). V telesu je okoli 6 mg Cr, njegova koncentracija pa se s starostjo znižuje. Pri zdravem človeku se Cr enakovredno razporedi med eritrociti in krvno plazmo. Cr^{6+} hitro prehaja celično membrano eritrocitov in se veže na hemoglobin, zato Cr uporabljamo pri oceni življenjske dobe eritrocitov. Oblika Cr^{3+} je večinoma vezana na frakcijo serumskega globulina (10).

Toksičnost Cr je odvisna od njegovega valenčnega števila. Oblika elementa Cr^{6+} je za človeka do desetkrat bolj toksična kot Cr^{3+} (3, 13). Nekatere raziskave kažejo, da je sicer esencialni Cr^{3+} lahko toksičen, če ga uživamo v prekomernih količinah. Cr^{3+} , ki se v obliki kromovega pikolinata, nahaja v prehranskih dopolnilih, lahko na daljši rok povzroči resne poškodbe ledvic in DNK (13, 16).

Koncentracijo Cr lahko določamo v polni krvi, plazmi, urinu in laseh. Določitev Cr je nemalokrat težavna, saj se v telesu nahaja v zelo nizkih koncentracijah. Metoda izbora je zato ICP-MS (5).

1.1.5 Mangan

Mangan (Mn) je tako aktivator kot tudi sestavni del številnih encimov. Encimi, ki jih aktivira Mn so hidrolaze, kinaze in transferaze katerih aktivnost lahko sproži tudi magnezij (8). Mn ima pomembno vlogo pri presnovi ogljikovih hidratov in lipidov, rasti in razmnoževanju, reakcijah oksidativne fosforilacije ter pri nastajanju kostnega in vezivnega tkiva (11, 13).

V naravi je to zelo razširjen element. Glavni vir Mn za človeka je hrana (10). Večino Mn zaužijemo s hrano kot so oreščki, listnata zelenjava in polnozrnatih izdelki (9).

V telesu je od 10 do 20 mg Mn. Na podoben način kot Fe, ga absorbiramo v tankem črevesu. Po absorpciji se v krvi ne zadržuje dolgo, saj se vezan na α_2 -makroglobulin hitro prenese do jeter, kjer se tudi skladišči. V obliki Mn^{2+} se po potrebi sprosti iz jeter in večinoma veže na manganov porfirin v eritrocitih. Oksidirana oblika Mn^{3+} je v manjših količinah prisotna v krvnem serumu kjer je vezana na β_1 -globulin (10). Izločanje Mn poteka preko žolča z blatom, v manjših količinah pa z urinom (9).

Njegovo pomanjkanje je ob uravnoteženi prehrani zelo redek pojav. Močno zvišane koncentracije Mn so posledica sproščanja elementa iz celic kjer se skladišči. Jetrni bolniki lahko zaradi povečanega sproščanja Mn iz hepatocitov in nezmožnosti izločanja Mn z žolčem, utrpijo nevrološke poškodbe. Kronična izpostavljenost prahu in hlapom Mn povzroči bolezenske znake podobne Parkinsonovi bolezni (4, 5, 8).

Pri določanju Mn moramo paziti na kontaminacijo, saj se element nahaja v prahu. Določamo ga lahko v polni krvi, plazmi in urinu (4, 5).

1.1.6 Molibden

Esencialnost molibdena (Mo) določa predvsem njegova vloga pri delovanju različnih metaloproteinov. Kot sestavni del molibdopterina, je Mo kofaktor aldehid oksidaze, ksantin oksidaze in sulfid oksidaze. Ti encimi so pomembni pri presnovi purinov in zdravilnih učinkovin. Najdemo ga v zemlji, onesnaženem zraku, vodi in hrani. Znano je, da se največ Mo akumulira v stročnicah, rižu, soji, poleg njih pa so dober vir tega elementa tudi živalska jetra (10).

Hitra in zadostna absorpcija Mo v želodcu in tankem črevesu je lahko motena zaradi visokih koncentracij Cu. Njegovo izločanje z urinom je sorazmerno z vnosom v telo (9, 13).

V krvi je Mo prisoten v plazmi, kjer potuje vezan na α_2 -makroglobulin, večinoma (80-90%) pa je trdno vezan na proteine v eritrocitnih membranah, predvsem spektrin (12, 13).

Njegova koncentracija v krvi se zviša takoj po obroku (12).

Pomanjkanje Mo pri zdravih ljudeh z uravnoteženo prehrano do sedaj še ni bilo opisano. Visoke koncentracije Mo in kopičenje njegovih spojin pri človeku povzroči visoke serumske koncentracije ceruloplazmina in sečne kisline. Pojavijo se simptomi putike. Izpostavljenost Mo lahko ogrozi ravnovesje Cu v organizmu (3, 4, 5).

1.1.7 Selen

Selen (Se) je esencialni element potreben za pravilno delovanje glutation peroksidaze, ki katalizira razgradnjo peroksidov nastalih med procesi oksidativnega metabolizma, in jodotironin dejodinaze, ki neaktivni ščitnični hormon T_4 pretvori v njegovo aktivno obliko T_3 . Za Se domnevajo, da je tesno povezan z delovanjem vitamina E (5, 17).

V prehranjevalno verigo se vključuje predvsem s hrano rastlinskega izvora, ki je bogata s selenmetioninom (9). Njegova koncentracija v zemlji je odvisna od geografskega področja. Priporočen dnevni vnos Se v posameznih državah zelo variira. Visoke vrednosti priporočenega vnosa Se tako veljajo za ZDA, Mehiko, Kanado, Venezuelo in Irsko, medtem ko so nižje vrednosti določene v državah kjer je Se v naravi malo – Egipt, Nova Zelandija, Italija (10).

Učinkovito se absorbira v prebavnem traktu, v telesu ga imamo od 3 do 15 mg. Po telesu se prenaša večinoma v krvni plazmi in počasi vstopa v rdeče krvne celice (10).

50-60 % plazemskega Se je vezanega na selenoprotein P, okoli 30 % na glutation peroksidazo, ostanek pa na albumin in selenometionin (9).

Posebna vrsta kardiomiopatije (Keshanova bolezen) se pojavlja na Kitajskem pri ljudeh, ki uživajo hrano revno s Se. Kronično pomanjkanje Se je povezano s karcinogenezo, fiziološko pomanjkanje Se pa se lahko pojavi med nosečnostjo (4, 5, 11, 17).

Ob prekomernem vnosu ali izpostavljenosti Se hitro postane toksičen. Visoke koncentracije v organizmu so hepato- in nevrotoksične. Selenoze se pojavljajo predvsem pri ljudeh, ki so Se poklicno izpostavljeni, in pri tistih, ki jemljejo veliko prehranskih dopolnil, bogatih s Se (5, 11, 13).

Koncentracijo Se lahko določimo v polni krvi, plazmi in urinu. Za oceno statusa Se se poleg določitve njegove koncentracije, lahko določa tudi aktivnost glutation peroksidaze. Visoka aktivnost tega encima se nahaja v levkocitih in makrofagih (3, 4, 5).

1.2 Metode določanja elementov v sledovih

Za določanje elementov v sledovih so se v preteklosti uporabljale tradicionalne metode mokre kemije kot so volumetrični in kolorimetrični postopki. Razvoj atomske spektroskopije sredi 60-ih let prejšnjega stoletja je povzročil, da se je ta visoko občutljiva in široko uporabna tehnika avtomatizirala tudi v klinične namene. Napredek atomske spektroskopije je neposredno vplival na naše razumevanje, kako pomembni so ti elementi za naš organizem (18).

Danes so nam za določanje elementov v sledovih na voljo različne detekcijske tehnike: kemične in elektrokemične metode, atomska emisijska spektroskopija (AES), plamenska atomska absorpcijska spektrometrija (FAAS), elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (ET-AAS), nevtronska aktivacijska analiza (NAA), masna spektrometrija in druge (7).

Za klinične namene mora biti metoda za določanje elementov v sledovih v bioloških vzorcih občutljiva (pomeni sposobnost metode, da zazna že majhno spremembo in se odzove z visokim signalom), specifična (pomeni sposobnost metode, da v zmesi podobnih snovi prepozna in izmeri koncentracijo iskanega analita), natančna (pove kakšno je sipanje meritev okoli prave vrednosti), točna (pove kako blizu prave vrednosti je povprečje meritev) in razmeroma hitra (7, 19).

V kliničnih laboratorijih po svetu najpogosteje uporabljajo FAAS in ET-AAS.

Poleg bolj ustaljenih metod, so v zadnjem času v uporabi tudi sklopljene tehnike: masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo in tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (HPLC-ICP-MS), atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES) ter masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) (7, 20).

1.2.1 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je učinkovita analizna tehnika za identifikacijo ionov, nastalih iz osnovne molekule. Vzorec ioniziramo in nato merimo prisotnost nastalih ionov z različnim razmerjem med maso in nabojem (m/z) ter njihovo relativno zastopanost. Glavni sestavni deli masnega spektrometra so ionski izvor, masni analizator in detektor.

V ionskem izvoru nastajajo ioni, ki se v masnem analizatorju ločijo glede na vrednost m/z . Nazadnje detektor izmeri intenziteto ionskega toka pri posamezni vrednosti m/z . Rezultat meritve je masni spekter, s katerim določimo maso in zgradbo molekul preiskovanega vzorca (21).

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

Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) se je razvila v 80-ih letih prejšnjega stoletja in se pokazala kot zelo obetavna in vsestranska metoda, ki omogoča hitro analizo različnih vzorcev (20). Medtem ko atomske absorpcijske tehnike prevladujejo v anorganskih analiznih postopkih, se ICP-MS uporablja za merjenje elementov v zelo nizkih koncentracijah in v laboratorijih, ki zahtevajo visoko stopnjo učinkovitosti (22).

V primerjavi z AAS je ICP-MS hitrejša, bolj točna in bolj občutljiva metoda. Z ICP-MS merimo elemente v koncentracijah $\mu\text{g/L}$ in ng/L . Poleg tega tehniko odlikujejo še široko merilno območje, možnost izotopske analize vzorcev ter razmeroma malo interferenc (7, 22).

ICP-MS je primerna za kvantitativno določanje izbranih elementov v sledovih v različnih bioloških vzorcih in je zaradi tega v zadnjih letih prešla v rutinsko uporabo v medicini (7). Zaradi kompleksnosti bioloških materialov je potrebna specifična predpriprava vzorca. Vzorec s pomočjo induktivno sklopljene plazme ioniziramo; nastale ione nato masni spektrometer loči in kvantificira na osnovi razmerja med maso in nabojem.

Sestavni deli ICP-MS so (Slika 1):

- sistem za uvajanje vzorca,
- gorilnik ICP in tuljava,
- vmesnik,
- vakuumski sistem,
- sistem ionskih leč,
- kolizijska celica,
- kvadrupolni masni spektrometer,
- detektor.

Večina vzorcev, ki jih analiziramo z ICP-MS, je tekočih. Preden vzorec pride do induktivno sklopljene plazme, ga je potrebno razpršiti v majhne kapljice. Tekoči vzorec s peristaltično črpalko črpamo skozi sistem za uvajanje vzorca do razpršilca, ki ustvari aerosole. Preden aerosoli vstopijo v plazmo preidejo skozi razpršilno komoro. Zaradi možnosti analitičnih napak, se v razpršilni komori večji aerosoli odstranijo, manjši pa vstopajo naprej v plazmo (22).

Gorilnik ICP z visokofrekvenčno ionizacijo argona (40,68 MHz) proizvaja plazmo. Ioni argona (Ar^+) in elektroni med seboj reagirajo v visokofrekvenčnem magnetnem polju, ki ga ustvarja tuljava, ovita okoli gorilnika. Nastala plazma dosega temperaturo od 6000°C do 10000°C . V plazmi se aerosoli vzorca posušijo do trdnega in nato segrejejo do plinskega stanja. Molekule razpadejo na atome. Medtem ko atomi potujejo skozi plazmo, pridobivajo energijo in sčasoma oddajo en elektron. Nastanejo ioni (kationi), ki nato skozi vmesnik potujejo do ionskih leč, masnega spektrometra in detektorja.

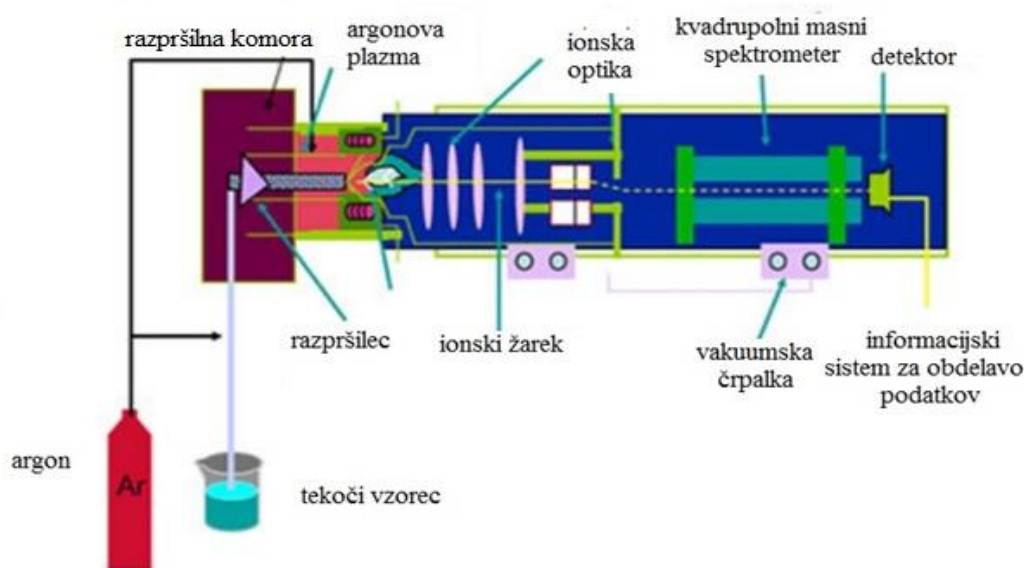
Ker kationi v plazmi nastajajo pri visokih temperaturah in atmosferskem tlaku, masni spektrometer pa deluje v vakuumu, je potreben dodaten vmesnik. Sestavljata ga dva stožca, običajno narejena iz niklja ali platine. V sredini obeh stožcev sta odprtini skozi kateri kationi potujejo do ionske optike.

Razdalja med vmesnikom in detektorjem je po navadi okoli enega metra. Ion, za katerega želimo, da prepotuje to razdaljo, ne sme trčiti ob nobeno drugo molekulo. Turbomolekularna in mehanska črpalka ustvarjata vakuum, ki med vmesnikom in detektorjem odstrani vse plinske molekule.

Ionska optika, sestavljena iz sistema leč, usmerja katione v masni analizator in odstrani odvečne nevtrone in fotone. Če želimo visoko učinkovitost, je odstranjevanje nevtronov in fotonov nujno. Interference pri analizi z ICP-MS nastanejo, ko imajo ioni iz plazme, vzorca ali obojega enako razmerje med maso in nabojem (m/z), kot iskani analit. Tovrstne interference odstranimo s pomočjo kolizijske celice med ionsko optiko in masnim spektrometrom.

Masni spektrometer deluje kot masni filter. Ločuje ione na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z). Zaradi visoke specifičnosti večina laboratorijev uporablja ICP-MS s kvadrupolnim masnim analizatorjem. Sestavljen je iz štirih vzporednih prevodnih palic, kjer s pomočjo enosmerne in izmenične napetosti poteče ločitev ionov.

Ioni, ki izstopijo iz masnega spektrometra, trčijo ob aktivno površino detektorja. Kaskadna reakcija na diodah detektorja se pretvori v merljiv električni signal (22, 23).



Slika 1: Shematski prikaz analizadorja ICP-MS (24)

1.3 Referenčno območje

Klinični laboratoriji referenčne vrednosti lahko povzamejo po dostopni literaturi, ali pa jih prevzamejo od proizvajalcev diagnostičnih testov in laboratorijske opreme. Zelo malo laboratorijev ob vpeljavi in uporabi nove tehnologije postavi lastne referenčne vrednosti in referenčna območja.

Na področju medicinskih znanosti je referenčno območje oz. referenčni interval, območje vrednosti fizioloških meritev pri zdravih ljudeh. Mednarodna zveza klinične kemije in laboratorijske medicine (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) je za referenčne vrednosti določila tiste vrednosti, za katere sta znani populacija in analitska metoda (25). Iz referenčnih vrednosti izračunamo referenčno območje.

V primeru normalne porazdelitve interval referenčnih vrednosti določata njegovi mejni vrednosti, tako da vključita 95% vseh rezultatov izmerjenih v populaciji predvidoma zdravih ljudi oziroma v populaciji, pri kateri ne moremo potrditi bolezni, ki bi lahko vplivala na laboratorijske meritve. Če gre za nenormalno porazdelitev referenčnih vrednosti, potem je referenčno območje omejeno z 2,5. in 97,5. percentilom vseh izmerjenih vrednosti (1).

Za določitev reprezentativnega referenčnega območja je ključna izbira populacije in nadzor ter spremljanje morebitnih vplivov v populaciji (starost, spol, kronične bolezni). Pomemben je tudi nadzor nad fiziološkimi dejavniki (cirkadiani ritem, prehrana, fizična aktivnost) ter ostali dejavniki, ki lahko vplivajo na meritev (izbira metode, izbira biološkega materiala, ravnanje z biološkimi vzorci).

Prednosti uporabe referenčnih območij sta vsekakor njihova dostopnost ter enostaven in hiter način primerjanja z laboratorijskimi meritvami pacientovega vzorca. Po drugi strani, referenčne vrednosti ne morejo potrditi prisotnosti ali odsotnosti bolezni, saj so vezane le na zdravo populacijo. Referenčna območja so rigidna, ker ne vključujejo izjem. Laboratorijske preiskave določenih posameznikov (npr.: vegetarijanci) lahko zato včasih odstopajo od povprečja zdrave populacije. Kljub nekaterim pomanjkljivostim in težavam pri interpretaciji, referenčna območja v medicini še vedno ostajajo nujno potrebna, saj odlikavajo človeško variabilnost (1).

Pojem »referenčni interval« sta leta 1969 skupaj predstavila Gräsbeck in Saris (26).

Pred letom 1969 se o postavljanju referenčnih območij ni vedelo veliko, saj tudi nabor preiskav v kliničnih laboratorijih ni bil tako širok kot je danes (27). Z razvojem družbe in tehnologije je to postalo eno izmed bolj pomembnih področij s katerimi so se začeli ukvarjati tako zdravniki kot tudi laboratorijsko osebje ter proizvajalci laboratorijske opreme in reagentov.

Leta 2008 je bil s strani CLSI izdan posodobljen protokol C28-A3, ki je pripomogel k bolj enotnemu postavljanju referenčnih območij v laboratorijih po vsem svetu.

1.3.1 Smernice CLSI

CLSI je v sodelovanju z IFCC leta 2008 izdal smernice za definiranje, postavljanje in potrjevanje referenčnih intervalov. Gre za dokument CLSI C28-A3: Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory.

To so priporočila, ki so namenjena uporabnikom diagnostičnih laboratorijskih testov.

CLSI C28-A3 vključuje številne napotke glede postavljanja referenčnih območij za nov analit ali novo laboratorijsko metodo. Rdeča nit smernic so referenčne vrednosti zdravih ljudi. Protokol je za uporabnikove namene zasnovan tako, da dosega minimalne standarde uporabnosti in zanesljivosti (27).

1.3.1.1 Protokol postavljanja referenčnih vrednosti

Najbolj pogosto uporabljene referenčne vrednosti (znane kot »normalne vrednosti« oz. »pričakovane vrednosti«) so bile skozi čas slabo definirane, vsekakor pa po svetu niso bile določene na enoten način, ki bi zagotavljal primerljivost. Osnova postavljanja referenčnih intervalov je zato v prvi vrsti postal sistematičen in vseskozi dokumentiran pristop.

Da bi bolje razumeli celoten proces, je potrebno poznavanje terminologije (Slika 2) kot tudi njena primerna uporaba (27).

Referenčni posameznik je posameznik, ki smo ga izbrali za primerjavo in kot tak ustreza določenim merilom.

Referenčna populacija vključuje vse referenčne posameznike. Po navadi je sestavljena iz neznanega števila enot.

Referenčna vzorčna skupina je določeno število izbranih posameznikov, ki predstavlja referenčno populacijo.

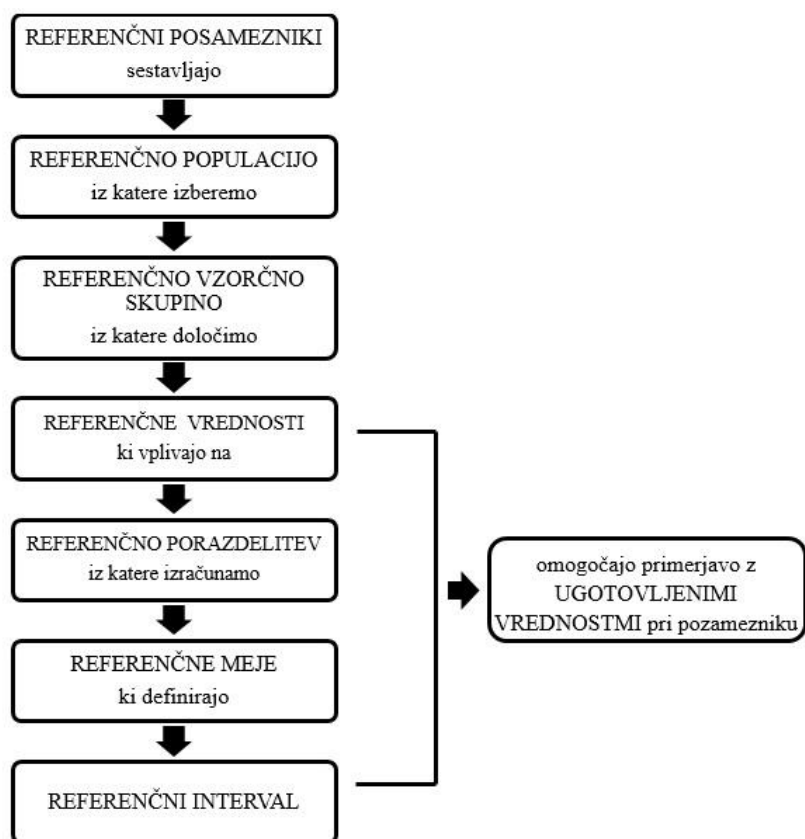
Referenčna vrednost je vrednost določenega parametra, ki smo jo pridobili z merjenjem ali opazovanjem le-tega pri referenčnem posamezniku.

Referenčna porazdelitev je porazdelitev referenčnih vrednosti. S pomočjo referenčne porazdelitve referenčne vzorčne skupine in primerno izbranih statističnih metod, lahko testiramo postavljeno hipotezo o referenčni porazdelitvi referenčne populacije.

Referenčna meja je vrednost, ki jo dobimo iz referenčne porazdelitve in se uporablja zgolj v opisne namene.

Referenčni interval je območje med, in vključno, dvema referenčnima mejama. Oblikovan je tako, da vključuje spodnjo in zgornjo referenčno mejo. V nekaterih primerih je pomembna le ena vrednost, po navadi zgornja.

Ugotovljena vrednost je pridobljena z merjenjem ali opazovanjem bolnikovih laboratorijskih preiskav.

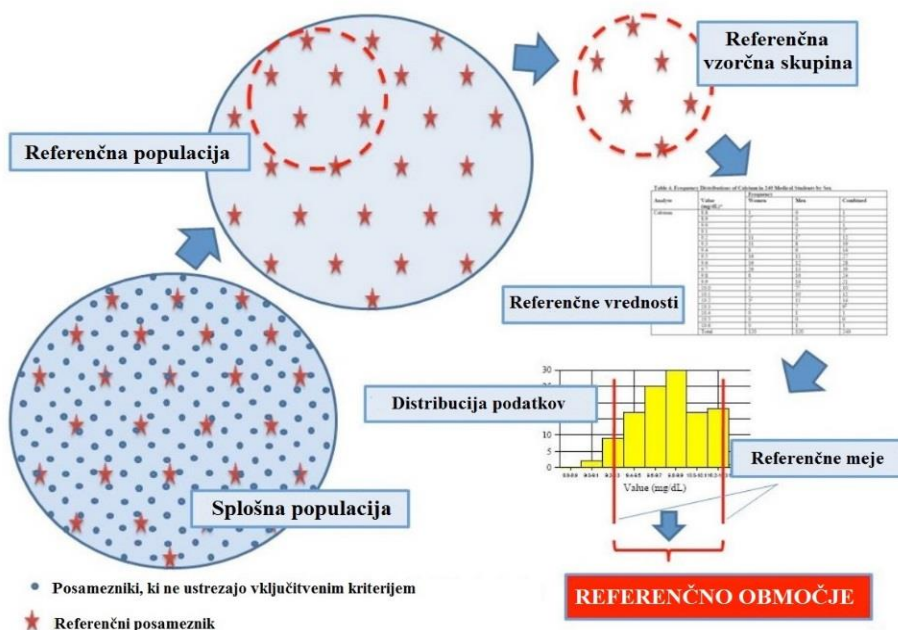


Slika 2: Odnosi med definiranimi izrazi (27)

Ko želimo postaviti referenčna območja za nov analit, drugačno populacijo ali pri vpeljavi nove metode z višjo občutljivostjo in specifičnostjo, je priporočljivo slediti določenim smernicam. Postavitev referenčnega intervala je odvisna od številnih spremenljivk, med katerimi so kriterij, s katerim izberemo referenčne posameznike (Slika 3), predanalitski dejavniki in statistična obdelava podatkov. Kljub temu pa sta izbrana analitska metoda in populacija iz katere izberemo referenčne posameznike, najbolj pomembni spremenljivki. Zato je zaželeno, da bi vsak laboratorij postavil svoja referenčna območja. V tem primeru je potrebno izvesti samostojno študijo in še pred začetkom dela preučiti vso literaturo o morebitnih analitičnih in bioloških dejavnikih, ki bi lahko vplivali na celoten proces. V nadaljevanju je priporočljivo postaviti kriterije, ki bodo določali kakšni posamezniki so lahko del študije. Smernice CLSI priporočajo sestavo jasnega in detajlnega vprašalnika, s pomočjo katerega preiskovance vključimo ali izključimo iz nadaljnjih korakov. Nadalje je vsakega izbranega posameznika potrebno seznaniti z namenom in potekom raziskave. Vsak izmed izbranih tudi podpiše jasno sestavljeno izjavo o sodelovanju, laboratorij pa je

dolžan slediti zakonodaji in regulativam s področja medicinske etike. Na podlagi odgovorov z vprašalnika ter na podlagi kliničnih opažanj, nato potencialne referenčne posameznike razvrstimo v skupine. Pomembno je, da pri tem izključimo vse, ki ne ustrezajo vključitvenim kriterijem in tudi tiste, za katere s kliničnim opažanjem ocenimo, da niso zdravi. Dokument CLSI prav tako priporoča izbiro primerne števila referenčnih posameznikov in predlaga, naj to ne bo manj kot 120 preiskovancev za neparametrično metodo. Vnaprej je potrebna sestava jasnih navodil za odvzem biološkega materiala in ravnanje z vzorci referenčnih posameznikov ter za ravnanje z bolnikovim vzorcem in njegovo obdelavo.

Ko so zbrani vsi vzorci, ki so bili odvzeti skladno z navodili, se lahko pod predpisanimi in nadzorovanimi pogoji opravi analiza z izbrano analitsko metodo. Rezultat analize so referenčne vrednosti za katere smernice CLSI nalagajo, naj se pred obdelavo pregledajo in preverijo, šele zatem statistično obdelajo s primernim programom. Priporočljiva je tudi izdelava histograma za lažjo oceno distribucije izmerjenih referenčnih vrednosti. Pri statistični obdelavi je pomembno, da ne spregledamo morebitnih napak ter da izločimo vse morebitne ubežnike, ki jih pri nadaljnji obravnavi ne upoštevamo. Glede na to, kako se podatki porazdeljujejo, je potrebno izbrati primerno metodo za določitev referenčnih mej in referenčnega območja. Pomembno je, da skozi celoten proces določanja referenčnih intervalov vsak korak in izveden postopek dokumentiramo in na koncu tudi upoštevamo (27).



Slika 3: Izbira posameznikov za določanje referenčnega območja (25)

2 NAMEN DELA

V rutinsko klinično uporabo za določanje koncentracije (esencialnih) elementov v sledovih želimo vpeljati novo metodo. Za interpretacijo laboratorijskih meritev potrebujemo zanesljiva referenčna območja.

Namen magistrske naloge je:

- določiti laboratoriju lastne referenčne vrednosti esencialnih elementov v sledovih (Cu, Zn, Co, Cr, Mn, Mo, Se) v krvni plazmi s pomočjo tehnologije ICP-MS, ki bodo veljale za oba spola odrasle slovenske populacije;
- ugotoviti, ali se referenčna območja za slovensko odraslo populacijo skladajo z ostalimi svetovnimi populacijami, ki jih za isto metodo navaja trenutno dostopna literatura;
- v primeru odstopanj ugotoviti vzroke neujemanj z ostalimi populacijami;
- ugotoviti, kako pomembna je postavitev laboratoriju lastnih referenčnih območij.

Pri našem delu smo sledili priporočilom CLSI za postavljanje referenčnih vrednosti in dokumentu CLSI o pred-analitičnih vplivih pri določanju elementov v sledovih (C38-A: Control of preanalytical variation in trace element determinations).

3 MATERIALI IN METODE

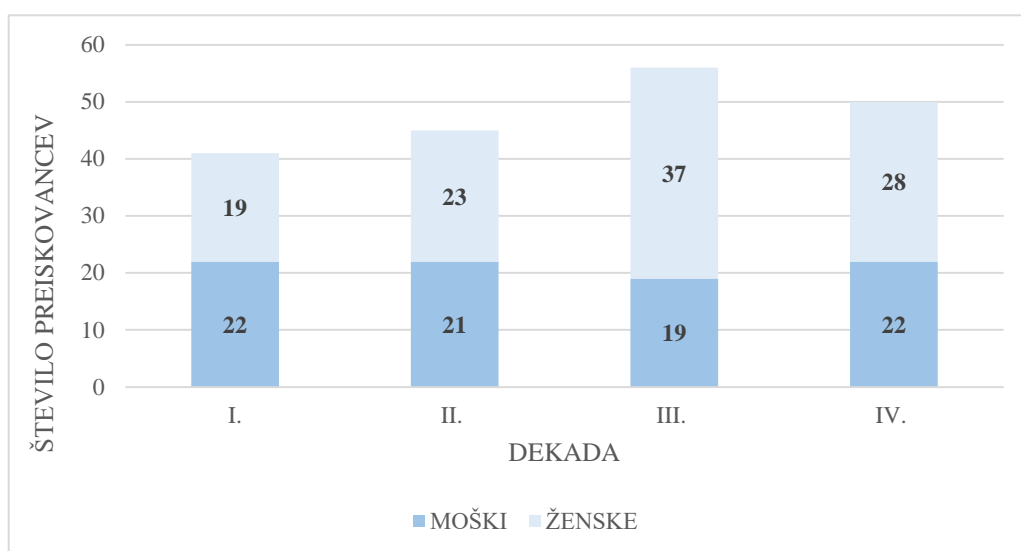
3.1 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 191 domnevno zdravih krvodajalcev, od tega 84 moških (44 odstotkov) in 107 žensk (56 odstotkov). Razdelili smo jih v štiri dekade. V prvo dekada smo vključili posameznike med 18. in 30. letom starosti, v drugo dekada preiskovance stare med 30 in 40 let, v tretji so preiskovanci stari med 40 in 50 let ter v zadnji, četrti dekadi, posamezniki med 50. in 65. letom starosti. Vse štiri dekade (Slika 4) smo skušali prirediti tako, da med njimi ni večjih številčnih razlik in tudi, da je številčna porazdelitev med moškimi in ženskimi preiskovanci znotraj dekade približno enaka.

Referenčne posameznike smo izbrali na *a priori* način kar pomeni, da je o izboru odločala ustreznost posameznika kriterijem, ki smo jih določili pred pričetkom študije.

Vsi preiskovanci so tako pred odvzemom vzorca in po poučitvi podpisali poseben obrazec privolitve za sodelovanje v raziskavi ter izpolnili vprašalnik na katerem so odgovorili na demografska vprašanja ter vprašanja o svojih razvadah (kajenje, jemanje zdravil, uživanje prehranskih dopolnil) in prehranjevalnih navadah.

Za raziskovalno nalogo je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko izdala dovoljenje (KME 83/04/08 in KME 109/02/13)



Slika 4: Razporeditev referenčnih posameznikov v dekade

3.2 Vzorci

Vzorci venske krvi so bili odvzeti na Zavodu za transfuzijsko medicino; Šlajmerjeva ulica 6, Ljubljana. Vsi vzorci so bili odvzeti v skladu z navodili Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo za odvzem biološkega materiala za določanje elementov v sledovih.

Kri je bila odvzeta v posebne vakuumske epruvete z antikoagulantom (EDTA), s temno modrim zamaškom, ki so namenjene za diagnostiko elementov v sledovih. Mesto odvzema je bilo očiščeno z alkoholom in ne razkužilom, ki bi vseboval jod. Igla je bila izdelana iz teflona ali nerjavečega jekla in ni vsebovala aluminijastih ali drugih kovinskih dodatkov. . Po odvzemu so vzorce večkrat počasi obrnili in s tem zagotovili enakomerno razporeditev antikoagulantna. Vzorce smo v dveh urah po odvzemu centrifugirali 10 minut pri obratih $1000 \times g$ in tako ločili krvno plazmo od krvnih celic. Odstranili smo zamašek in krvno plazmo prenesli v polipropilenske epruvete s plastičnim zamaškom (28).

Vzorce smo do analize hranili v zamrzovalniku na -20°C .

3.3 Delovno okolje, oprema in laboratorijski pribor

Analize so potekale v sobi s čistim, filtriranim in klimatsko hlajenim zrakom, kjer se nahaja tudi masni spektrometer. Kalibracijske in standardne raztopine ter vzorce smo pripravili v plastičnih epruveh in jih kasneje analizirali v plastičnih posodicah. Meritve vseh esencialnih elementov v vzorcih smo opravili na analizatorju Agilent 7700x ICP-MS. Pri delu smo uporabljali različne avtomatske pipete s plastičnimi nastavki za enkratno uporabo. Vseskozi smo sledili priporočilom CLSI in možnost kontaminacije med pripravo in analizo vseh vzorcev zmanjšali z obvladovanjem predanalitskih dejavnikov.

3.4 Kemikalije, standardi in kontrolni material

Za določanje elementov v sledovih smo uporabili reagente in kemikalije z visoko stopnjo čistosti.

- HNO₃ (65% - suprapur quality, Merck, Nemčija)
- HCl (30% - suprapur quality, Merck, Nemčija)
- EDTA 99,995% (trace metal basis, Sigma-Aldrich, ZDA)
- Triton X-100 (suprapur quality, Sigma-Aldrich, ZDA)
- 1-butanol (≥99,4%, Sigma-Aldrich, ZDA)
- raztopina amonijevega hidroksida TraceSELECT Ultra (≥25%, Sigma-Aldrich, ZDA)
- ICP-MS Tuning Solution (Agilent Technologies, ZDA)
- ICP-MS Internal StdMix (Agilent Technologies, ZDA)
- sterilna voda B. Braun (Meisungen., Nemčija)
- kalibrator ICP-MS IV-STOCK-27 (Inorganic Ventures, ZDA)
- kalibrator ICP-MS IV-STOCK-57 (Inorganic Ventures, ZDA)
- kalibrator ICP-MS Gold (Inorganic Ventures, ZDA)
- Hg kalibracijski standard (Merck, Nemčija)
- Seronorm Trace Elements serum L-1 (Sero, Norveška)
- nosilni plin argon (99,99%, Linde, Nemčija)
- kolizijski plin helij (99,99%, Linde, Nemčija)

3.4.1 Priprava sistemskih tekočin

Osnovna amonijeve raztopina:

Osnovno amonijevo raztopino smo potrebovali za spiranje analitskega sistema ICP-MS, za pripravo amonijeve raztopine z internim standardom (ISTD) ter za redčenje vzorcev.

6,3 mL 1-butanola smo dodali 0,203 mL Tritona X-100, 3,75 mL raztopine amonijevega hidroksida ter 0,196 g EDTA. Plastenko smo nato z vodo B. Braun dopolnili do 350 mL in dobro premešali.

Amonijeve raztopina z internim standardom (ISTD):

Pripravili smo jo v dilutorju. 170 μ L internega standarda ICP-MS Internal StdMix smo redčili z 350 mL osnovne amonijeve raztopine.

Raztopina za umerjanje analizatorja (Tune Solution):

Pripravili smo jo s 5 μ L ICP-MS Tuning Solution, redčenih v 50 mL 2% HNO₃.

2% HNO₃ raztopino smo pripravili z redčenjem 30,8 mL 65% HNO₃ v vodi B. Braun do 1000 mL.

Raztopina kisline za spiranje analizatorja:

Za pripravo raztopine za spiranje aparata ICP-MS smo potrebovali 65% HNO₃ in 30% HCl. 20 mL 65% HNO₃ in 10 mL 30% HCl smo dodali vodo B. Braun do 1000 mL.

Raztopina za čiščenje stožcev in steklenih delov analizatorja:

Uporabljali smo 3,2% raztopino HNO₃. Pripravili smo jo tako, da smo 50 mL 65% HNO₃ redčili z vodo B. Braun do 1000 mL.

3.4.2 Priprava standardnih kalibracijskih raztopin in kontrolnega materiala

Najprej smo pripravili delovno raztopino Hg. 100 µL osnovnega kalibracijskega standarda Hg smo redčili z 9900 µL osnovne amonijeve raztopine.

V dve 10 mL epruveti smo nato pripravili osnovni raztopini S1 in S2.

Osnovna raztopina S1:

- 1 mL kalibratorja ICP-MS IV-STOCK-27
- 1 mL kalibratorja ICP-MS IV-STOCK-57
- 1 mL kalibratorja ICP-MS Gold
- 1 mL delovne raztopine Hg
- 6 mL osnovne amonijeve raztopine

Osnovna raztopina S2:

- 1 mL kalibratorja ICP-MS IV-STOCK-27
- 1 mL kalibratorja ICP-MS IV-STOCK-57
- 8 mL osnovne amonijeve raztopine

Večkrat smo analizirali slepi vzorec, ki smo ga pripravili z redčenjem 1 mL osnovne amonijeve raztopine v 10 mL amonijeve raztopine z ISTD.

Iz osnovnih raztopin S1 in S2, ter osnovne amonijeve raztopine smo nato pripravili standardne kalibracijske raztopine. Priprava je prikazana v spodnji preglednici.

Preglednica I: Priprava standardnih kalibracijskih raztopin

| raztopina | koncentracija (μL) | standardna raztopina | | osnovna amonijeve raztopina (mL) |
|---------------------------------|---|-----------------------------|----------|---|
| | | (mL) | | |
| STD-1000 | 1000 | / | S2 | / |
| STD-500 | 500 | 3 | S2 | 3 |
| STD-250 | 250 | 2 | S2 | 6 |
| STD-100 | 100 | 1 | S1 | 9 |
| STD-50 | 50 | 0,5 | S1 | 9,5 |
| STD-10 | 10 | 0,1 | S1 | 9,9 |
| STD-5 | 5 | 0,5 | STD-100 | 9,5 |
| STD-1 | 1 | 0,1 | STD-100 | 9,9 |
| STD-0,5 | 0,5 | 1 | STD-1 | 1 |
| STD-0,25 | 0,25 | 1 | STD-0,5 | 1 |
| STD-0,125 | 0,125 | 1 | STD-0,25 | 1 |
| STD-0 (slepi vzorec) | 0 | / | / | 10 |
| STD-75 (kontrola) | 75 | 0,75 | S1 | 9,25 |

3.5 Merjenje analitov

Pred pričetkom dela smo vedno naredili umeritveno krivuljo, zato smo iz kalibracijskih raztopin najprej pripravili delovne kalibracijske raztopine. Dobili smo jih tako, da smo v 200 μ L vsake kalibracijske raztopine dodali 2 mL pripravljene amonijeve raztopine z internim standardom, ter jih pred analizo dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Tako pripravljene delovne kalibracijske raztopine smo prelili v plastične posodice in jih postavili na ustrezno mesto na analizatorju. Na spremljajočem računalniku se je po opravljeni meritvi delovnih kalibracijskih raztopin izrisala umeritvena krivulja.

Kot kontrolni material smo uporabili Seronorm Trace Elements Serum L-1. 200 μ L kontrolnega materiala smo redčili z 2 mL amonijeve raztopine z internim standardom. Meritve kontrolnega materiala smo vedno izvedli na začetku analize. Če so bile vrednosti v predvidenem intervalu, smo nadaljevali z meritvami elementov v vzorcih krvne plazme. Kontrolne vzorce smo ponovno analizirali na vsakih 15-20 vzorcev, ter tudi na koncu celotne serije.

Zamrznjene vzorce krvne plazme smo pred meritvami odtajali na sobni temperaturi in jih pred redčenjem dobro premešali na mešalniku. Vzorce smo pripravili na enak način kot delovne kalibracijske raztopine in kontrolni material. K 200 μ L vzorca smo dodali 2 mL amonijeve raztopine z internim standardom, premešali na vibracijskem mešalniku in nato prelili v plastično posodico ter postavili na ustrezno mesto na analizatorju.

3.6 Statistična analiza

Normalno porazdelitev rezultatov za posamezen element smo testirali z neparametričnim testom Kolmogorov-Smirnov. Ta test temelji na razliki med vzorčno kumulativno porazdelitvijo in normalno kumulativno porazdelitvijo. Ničelna hipoteza (H_0) pri testu Kolmogorov-Smirnov je, da se spremenljivka porazdeljuje normalno, alternativna hipoteza (H_A) pa da se spremenljivka porazdeljuje nenormalno. Obojestranski interval zaupanja (95%) smo določili z $\alpha=0,05$. Ko je bil $P \geq \alpha$, smo sprejeli ničelno hipotezo H_0 (spremenljivka se porazdeljuje normalno) in uporabili parametrične teste. Če je bil $P < \alpha$, smo sprejeli alternativno hipotezo H_A (spremenljivka se ne porazdeljuje normalno) in uporabili neparametrične teste.

Izstopajoče vrednosti smo po priporočilih dokumenta CLSI določili s pomočjo testa po Reedu ali testa po Tukeyu. Metoda po Reedu temelji na razmerju med vrednostima D in R , kjer je D absolutna razlika med dvema najvišjima vrednostima iz nabora podatkov, R pa predstavlja razpon vseh dobljenih vrednosti. Če je vrednost D enaka ali večja od tretjine vrednosti R , potem je najvišja določena vrednost iz nabora podatkov ubežnik (29).

Test po Tukeyu v primerjavi s testom po Reedu več vrednosti prepozna kot ubežnike. Metoda po Tukeyu je uporabna predvsem zato, ker s pomočjo interkvartilnih vrednosti (razlika med zgornjim in spodnjim kvartilom) izloči zelo visoke in zelo nizke vrednosti. V teoriji, se na takšen način izloči okoli 0,7% vseh vrednosti, ki so del normalne Gaussove porazdelitve (30).

Percentile in 90 % intervale zaupanja referenčnih limit smo izračunali upoštevajoč standarde CLSI.

Statistično analizo pridobljenih podatkov smo opravili s programoma Microsoft Office Excel (Microsoft, ZDA) in MedCalc Statistical Software 11.4.2.0 (MedCalc Software, Belgija).

4 REZULTATI

V skladu z dokumentom CLSI, ki za postavitev referenčnega intervala priporoča neparametrično metodo (katere prednosti sta predvsem njena enostavnost in zanesljivost), smo podatke pri vseh esencialnih elementih v sledovih (razen pri Se) povzeli po neparametrični metodi.

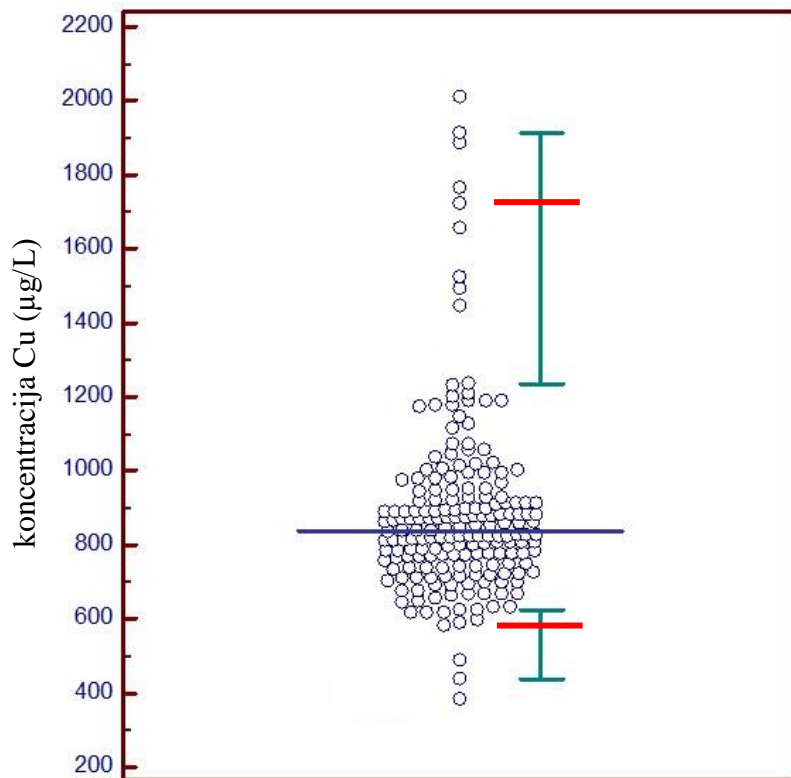
CLSI nadalje navaja, da je za uporabo neparametrične metode potrebno minimalno 120 referenčnih vrednosti. Temu kriteriju smo zadostili, saj smo v svojo analizo pri vsakem elementu vključili 191 vrednosti; razen pri Cr smo obdelali 187 meritev. Se je edini element pri katerem smo referenčno območje določili s pomočjo metode normalne porazdelitve.

Ubežnike smo pri vseh elementih določili z metodo po Reedu, saj smo opazili, da bi pri nekaterih elementih (Zn) z metodo po Tukeyu izgubili preveč (12%) podatkov.

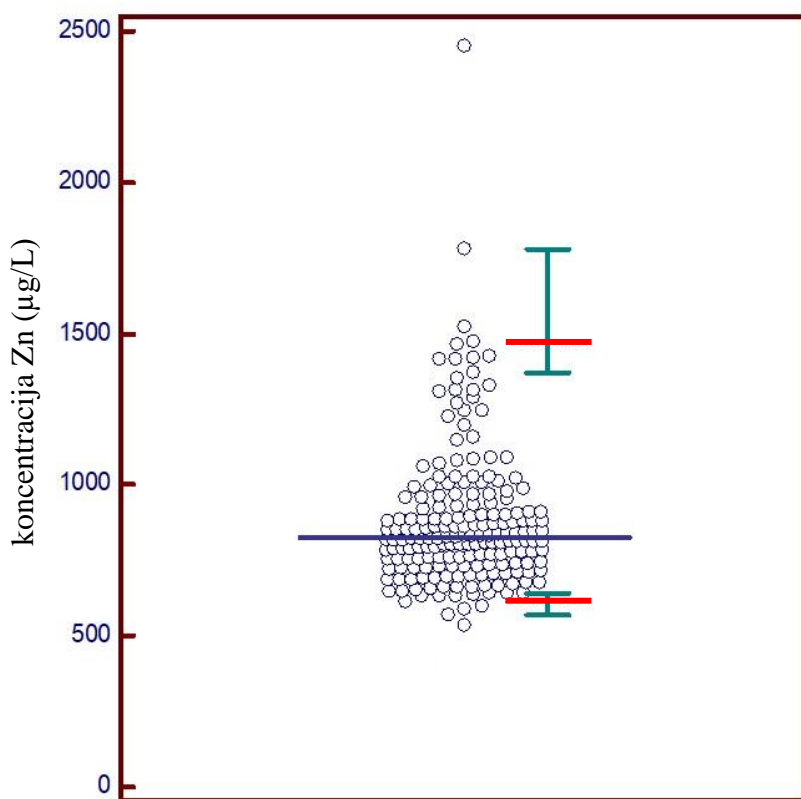
Pri Co, Cr in Mn smo določili le zgornjo mejo referenčnega območja, saj so bile vrednosti tako nizke, da se nam postavitev spodnje meje ni zdela smiselna.

Pri izračunu referenčnih mej smo pri vseh spremenljivkah upoštevali 95% interval zaupanja.

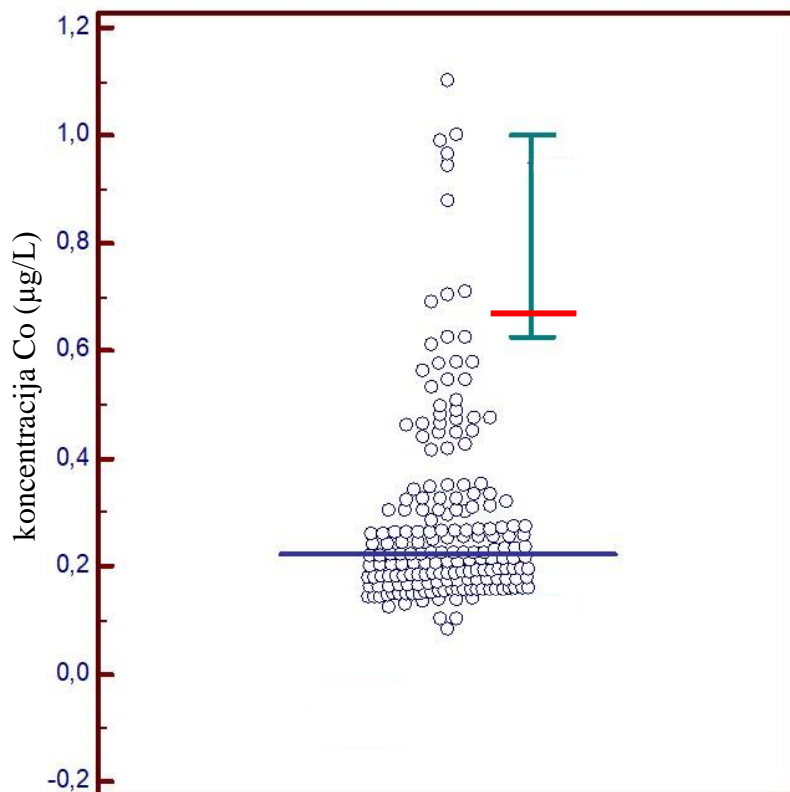
Rezultati naših meritev so za vsak element posebej prikazani na grafih (Slika 5, Slika 6, Slika 7, Slika 8, Slika 9, Slika 10, Slika 11). Rdeča črta na grafu prikazuje mejo referenčnega območja za neparametrično metodo, svetlo modra pa mejo referenčnega območja po metodi normalne porazdelitve (pri Se). Temno modra črta na grafu predstavlja mediano oz. aritmetično sredino pri Se.



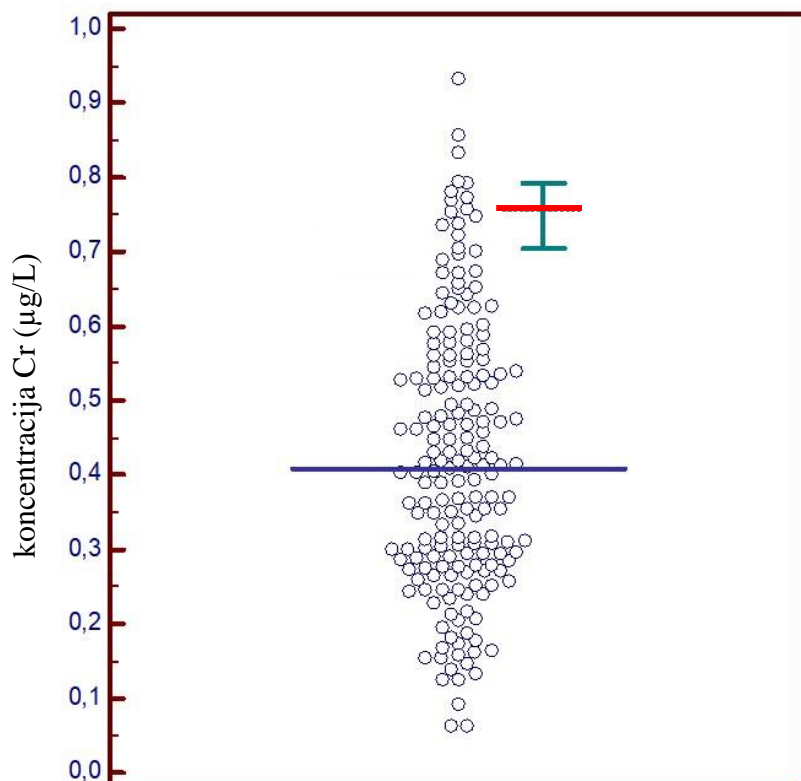
Slika 5: Graf porazdelitve podatkov za Cu



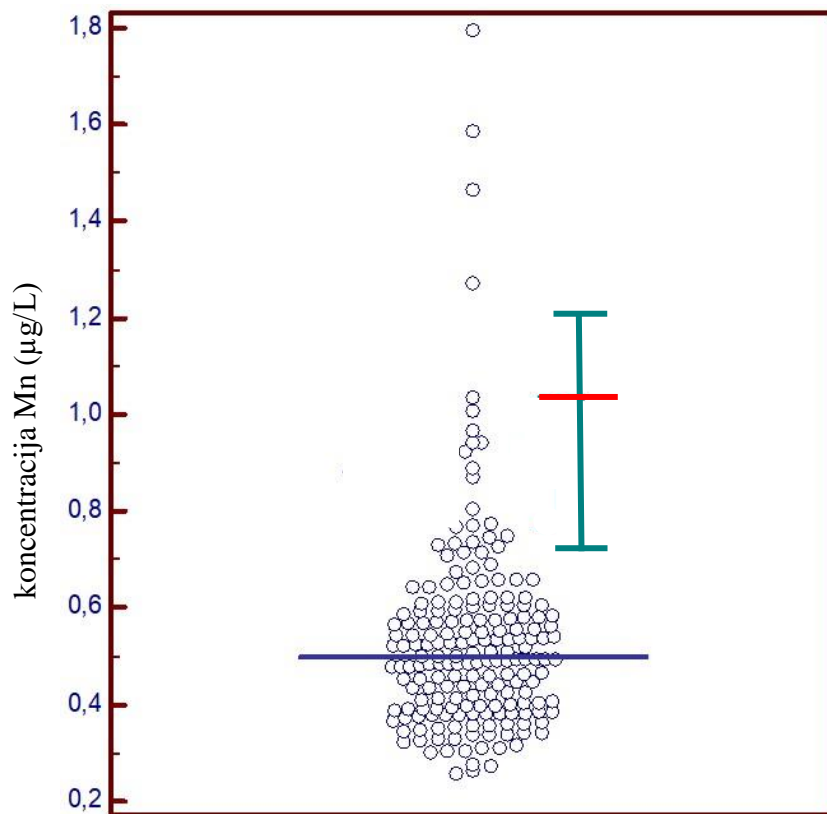
Slika 6: Graf porazdelitve podatkov za Zn



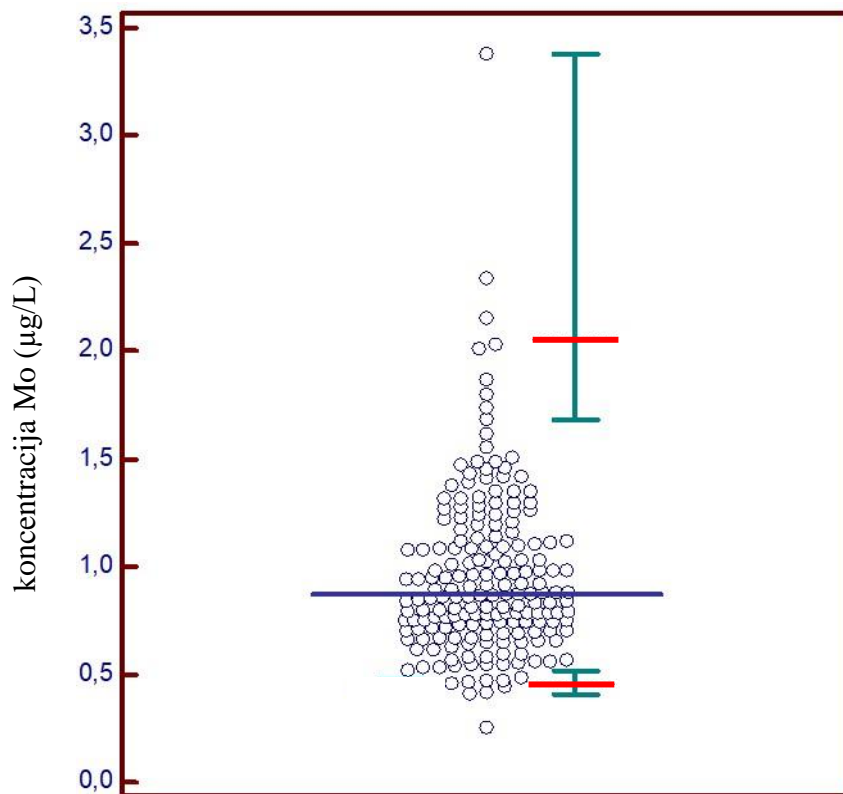
Slika 7: Graf porazdelitve podatkov za Co



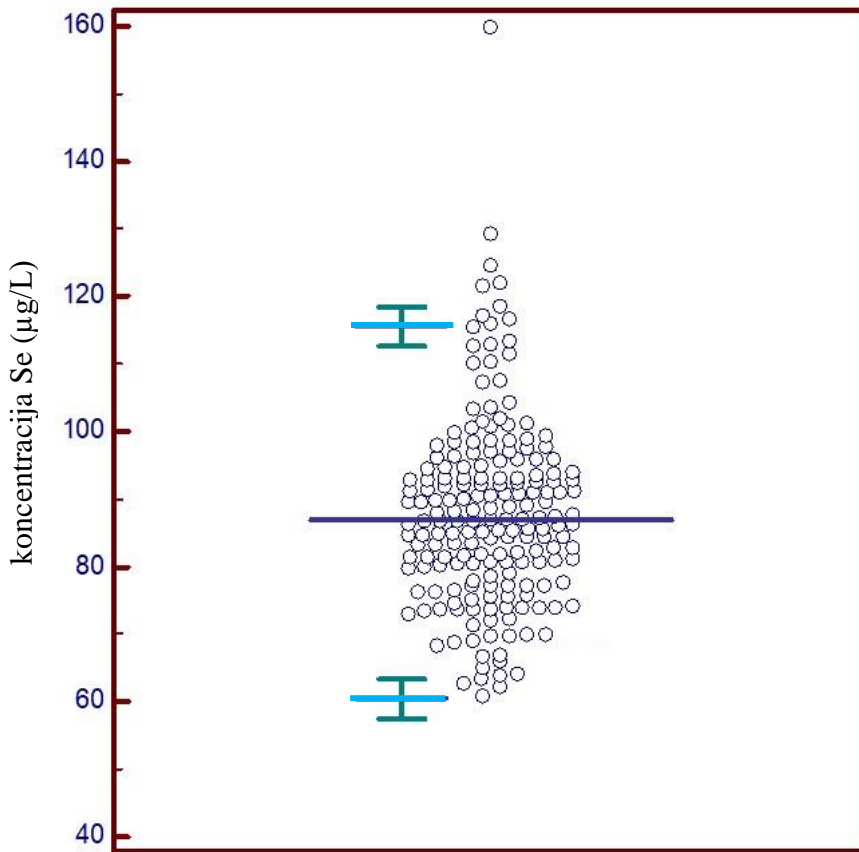
Slika 8: Graf porazdelitve podatkov za Cr



Slika 9: Graf porazdelitve podatkov za Mn



Slika 10: Graf porazdelitve podatkov za Mo



Slika 11: Graf porazdelitve podatkov za Se

Referenčna območja sedmih esencialnih elementov v sledovih so zbrana v Preglednici II. V zadnjih dveh stolpcih so navedeni 90% intervali zaupanja (90% CI) za spodnjo in zgornjo mejo referenčnega območja.

Normalno porazdelitev podatkov smo spremljali s testom Kolmogorov-Smirnov. Pri vseh spremenljivkah je bil $P < 0,0001$, le pri Se je bil $P = 0,1508$. Pri Se smo se zato odločili za parametrično metodo in v Preglednici II navedli vrednost aritmetične sredine (*).

Preglednica II: Referenčna območja esencialnih elementov v sledovih

| element | število preiskovancev | mediana ($\mu\text{g/L}$) | referenčno območje ($\mu\text{g/L}$) | 90 % CI ($\mu\text{g/L}$) | |
|-----------|--------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------|--------------|
| | | | | spodnja meja | zgornja meja |
| Cu | 191 | 837,0 | 586-1730 | 436-623 | 1235-1912 |
| Zn | 191 | 826,5 | 610-1434 | 568-640 | 1353-1523 |
| Co | 191 | 0,2 | < 0,65 | | 0,56-0,94 |
| Cr | 187 | 0,4 | < 0,75 | | 0,71-0,79 |
| Mn | 191 | 0,5 | < 1,1 | | 0,92-1,58 |
| Mo | 191 | 0,9 | 0,46-2,1 | 0,41-0,52 | 1,68-3,38 |
| Se | 191 | 88,0* | 60,5-115,6 | 57,6-63,4 | 112,7-118,5 |

5 RAZPRAVA

Magistrsko delo predstavlja raziskavo na področju esencialnih elementov v sledovih določenih z ICP-MS, ki velja za odraslo slovensko populacijo.

Dela smo se lotili sistematično, upoštevajoč priporočila CLSI za določanje referenčnih območij. S statistično analizo smo ugotavljali ali gre za normalno ali nenormalno porazdeljevanje podatkov. V nadaljevanju smo se, glede na porazdelitev podatkov, odločili za parametrično ali neparametrično metodo. Nenormalno porazdeljevanje podatkov smo pričakovali pri vseh spremenljivkah, saj elementi v sledovih niso endogeno sintetizirane snovi. Čeprav gre za esencialne elemente in zato (zdrav) organizem konstantno vzdržuje njihovo ravnovesje, je koncentracija esencialnih elementov v telesu odvisna od vnosa le-teh. Prav zaradi tega smo se v večini primerov odločili, da bomo za referenčna območja esencialnih elementov v sledovih, katerih podatki se niso razporejali normalno, uporabili neparametrično metodo z upoštevanjem vseh ubežnikov.

Glede na trenutno razpoložljivo literaturo o postavljanju referenčnih intervalov esencialnih elementov v sledovih ter dejstvo, da so ti nujno potrebni za človeški metabolizem in so bili zato prisotni pri vseh naših preiskovancih, smo pričakovali, da se naši rezultati ne bodo značilno razlikovali od rezultatov do sedaj objavljenih študij, ki so bile opravljene z isto metodo. Kljub temu smo imeli v mislih, da lahko pri nekaterih elementih pride do odstopanj.

Dosedanje študije so namreč pokazale, da se koncentracije elementov v sledovih pri zdravih prostovoljcih, lahko razlikujejo glede na starost, spol, življenjski slog, prehranjevalne navade in razvade ter (glede na to da se ti elementi nahajajo v zemlji, zraku in vodi) tudi okolje v katerem živijo (31, 32, 33, 34). Zaradi naštetih dejavnikov, bi bilo potrebno referenčna območja za elemente v sledovih periodično preverjati, saj se nenehno spreminjajo (35).

Razlike v referenčnih vrednostih za posamezen element pa niso vedno posledica bioloških sprememb in značilnosti posameznika, temveč tudi napak med samim analitskim ali pred analitskim postopkom. Posledice, na primer, nepravilnega odvzema, hranjenja in ravnanja z vzorci lahko privedejo do signifikantnih razlik v rezultatih raziskav (35, 36).

Kmalu smo ugotovili, da je težko najti primerljive podatke. Možna vzroka za različna referenčna območja sta vsekakor uporaba druge metode določanja ter drugačen biološki vzorec, njegova priprava in shranjevanje. Poleg tega so v dosedanjih publikacijah,

raziskovalci za analizo z ICP-MS najpogosteje uporabljali polno kri ali serum (34, 36, 37) ter urin, saj gre za najlažje dostopen vzorec (36, 37, 38). Med iskanjem primerne literature smo opazili tudi, da se je veliko strokovnjakov, bolj kot na esencialne, osredotočilo na raziskovanje vpliva toksičnih elementov in postavljanje referenčnih vrednosti za le-te.

Skušali smo zbrati podatke, ki bi bili primerljivi z našimi rezultati. Pri pregledovanju tuje literature smo bili pozorni predvsem na metodo (ICP-MS) in biološki vzorec (krvna plazma). V Preglednici III so zbrani rezultati naše raziskave (Slovenija) ter študij iz Francije, Švedske, Švice, ZDA in Nove Zelandije (NZ).

Preglednica III: Primerjava referenčnih območij določenih z ICP-MS metodo med odraslo slovensko in nekaterimi svetovnimi populacijami

| | Slovenija ¹ | Francija ¹ | NZ ¹ | Švedska ² | Švica ² | ZDA ² |
|-----------|---------------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|--------------------|------------------|
| | | (37) | (39) | (40) | (41) | (42) |
| element | referenčno območje (µg/L) | | | | | |
| Cu | 586-1730 | 794-2023 | 782-1099 | 740-1300 | 688-1803 | 750-1450 |
| Zn | 610-1434 | 551-925 | 654-1112 | 420-710 | 637-1004 | 660-1100 |
| Co | < 0,65 | 0,30-1,02 | < 0,71 | 0,03-0,18 | < 0,16 | < 0,90 |
| Cr | < 0,75 | | 0,05-1,04 | 0,05-0,48 | | < 0,3 |
| Mn | < 1,10 | 0,63-2,26 | | 0,30-1,04 | < 1,48 | < 2,4 |
| Mo | 0,46-2,1 | 0,67-1,68 | | 0,27-0,85 | < 3,00 | 0,3-2,0 |
| Se | 60,5-115,6 | 79-141 | 36-111 | 74-90 | 87,3-143,5 | 70-150 |

¹ Vzorec: plazma.

² Vzorec: serum.

5.1 Baker

Raziskovalci po vsem svetu so v zadnjih desetletjih dobro raziskali metabolizem Cu. Objavljene so bile študije določanja Cu v serumu, ki so jih določili z drugačnimi tehnologijami kot mi - predvsem z NAA in AAS. Vrednosti, ki so jih v zadnjih 25 letih pridobili z omenjenima metodama so dokaj konsistentne, kar kaže na neproblematično določanje Cu. V zadnjih letih se uporaba metod kot so AAS, NAA in ET-AAS v raziskovalne namene opušča. Prihod ICP-MS tehnologije je namreč omogočil hkratno in hitrejšo določitev večjega števila elementov v sledovih v različnih vzorcih in tako lahko danes med literaturo najdemo veliko objav, ki s to metodo obravnavajo Cu in ostale esencialne ter toksične elemente (43).

Pri bakru ugotavljamo, da so referenčna območja različna, med njimi pa z opazno nižjo zgornjo mejo najbolj izstopa referenčni interval za Novo Zelandijo.

Geografska lega je nedvomno en izmed dejavnikov, ki lahko vpliva na referenčno območje Cu pri posameznih populacijah. Koncentracije Cu v zemlji se v Evropi razlikujejo; najnižje so v Skandinaviji (44, 45). To bi lahko pojasnilo razliko med referenčnim območjem pri slovenski (586-1730 $\mu\text{g/L}$) in švedski (740-1300 $\mu\text{g/L}$); ter švedski in švicarski (688-1803 $\mu\text{g/L}$) populaciji. Čeprav so Švicarji raziskavo opravili v vzorcih z drugačnim medijem (serum) so njihove ugotovitve primerljive z našimi. Podobnosti pripisujemo geografski bližini (podnebje, Alpe, voda) in ne tako različnim prehranjevalnim navadam.

Kopičenje Cu v zemlji je večinoma posledica človeških dejavnikov. Znano je, da je koncentracija Cu v industrijskih in rudarskih območjih višja kot drugod (46). Poseganje človeka v naravo se kaže tudi z vse bolj razširjeno uporabo gnojil. Pesticidi ki vsebujejo Cu se pogosto uporabljajo v vinogradih in sadovnjakih, kar je lahko razlog višjih koncentracij Cu v zemlji mediteranskih držav (46, 47).

Možno je, da so razlike med našo in francosko populacijo, kljub uporabi iste metode in istega vzorca, ravno posledica uporabe tovrstnih pesticidov. Znano je namreč, da so Francozi v svetovnem vrhu po uživanju različnih vrst vin. Vinsko trto pridelovalci po navadi škropijo z modro galico (bakrov (II) sulfat) čigar ostanki so nato prisotni tudi v vinu (44, 46). O višjih koncentracijah Cu pri posameznikih, ki uživajo veliko vina, poročajo tudi raziskovalci iz Nigerije (48).

WHO kot referenčni interval za Cu v serumu navaja območje med 800 in 1000 $\mu\text{g/L}$ pri čemer je poudarjeno, da podatek velja za moško populacijo (8). To referenčno območje težko primerjamo s slovenskim, saj naše velja za oba spola.

V nekaterih virih (39, 41) smo opazili, da so raziskovalci referenčno območje postavili ločeno za moško in žensko populacijo. Koncentracija Cu v krvnem serumu je namreč višja pri ženskah kot pri moških (34, 49). Povišane serumske koncentracije Cu pri ženskah so lahko posledica nosečnosti, predvsem pa jemanja estrogenskih oralnih kontraceptivov (34, 49, 50). Slednji v jetrih povečajo tvorbo ceruloplazmina, glavnega plazemskega proteina na katerega se veže Cu (51). To potrjujejo tudi študije opravljene pri deklicah in dečkih katerih rezultati kažejo, da so koncentracije Cu pri 10-letnih deklicah enake kot pri enako starih dečkih (52, 53). Pri slovenski populaciji sicer referenčnega območja za Cu nismo postavili posebej za moško in žensko populacijo, lahko pa to postane predmet raziskav v prihodnosti.

Glede na to, da smo v našo študijo zajeli več žensk kot moških, so višje vrednosti pri slovenski populaciji (v primerjavi s švedsko in ameriško) lahko posledica prav tega.

V laboratorijih klinike Mayo ne navajajo podrobnosti o preiskovani populaciji, Rodushkin pa je na Švedskem preiskavo opravil na enakem številu vzorcev moških in žensk.

Da je izbira referenčne populacije pri meritvah koncentracije Cu še kako pomembna, nakazujejo tudi podatki laboratorijev iz ZDA. Pri njih namreč navajajo različna referenčna območja za različne starostne skupine do 10 let. Za odraslega človeka (11 let in več) je referenčno območje za Cu med 750 in 1450 $\mu\text{g/L}$ (42). Naši preiskovanci so bili starejši od 18 let, zato so lahko razlike (poleg uporabe drugačnega medija) med slovensko in ameriško populacijo posledica meritev pri drugačni starostni skupini.

Vzrok različnih referenčnih območij je pri Cu lahko tudi cirkadiani ritem. Koncentracija tega elementa v serumu je tesno povezana s koncentracijo njegovega glavnega prenašalnega proteina, ceruloplazmina. Liftschitz in Henkin sta v svoji študiji dokazala, da je koncentracija serumskega Cu najvišja med 10. in 14. uro (54). Odvzem vzorcev je pri naši študiji potekal prav v tem časovnem intervalu; podatkov o tem kdaj so vzorce jemali pri drugih študijah nimamo, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je cirkadiani ritem glavni vzrok nekaterih odstopanj.

V primerjavi z ostalimi, naše referenčno območje za Cu najbolj odstopa od novozelandskega. Natančnejših podatkov o referenčni populaciji in času vzorčenja

nimamo, smo pa opazili, da je razpon referenčnega intervala pri Novozelanceh najmanjši. Vzrok bi bil lahko uporaba drugačnega statističnega pristopa (iskanje ubežnikov). Povsem možno je, da so raziskovalci na Novi Zelandiji uporabili metodo po Tukeyu in tako izločili večje število vrednosti, kar je lahko imelo za posledico ožji razpon referenčnega območja.

5.2 Cink

Pri referenčnih območjih za Zn ugotavljamo zelo različne vrednosti. Znano je da so razlike v koncentracijah tega elementa odvisne od številnih dejavnikov: stresa, posta, jemanja zdravil ali nosečnosti (55).

Vpliv cirkadianega ritma je prav tako lahko vzrok odstopanj med populacijami. Koncentracije Zn v krvi so namreč najvišje v dopoldanskem času (12, 39). Takrat so bili odvzeti naši vzorci. Naše vrednosti so višje od francoskih in novozelandskih. Goullé v članku ne navaja časa odvzema in možno je, da so bili njihovi vzorci odvzeti kasneje in so zato vrednosti referenčnega območja za francosko populacijo nižje (37). Podatka o odvzemu pri novozelandskih preiskovancih nimamo.

V devetdesetih letih prejšnjega stoletja so mnoge evropske in severno ameriške države pričele z biomonitoringom Zn in v glavnem so bile te študije opravljene na vzorcih polne krvi. Referenčna območja postavljena v Španiji se takrat niso pretirano razlikovala od tistih v Italiji in na Češkem, so pa bila mnogo višja od rezultatov, ki so jih dobili na Kitajskem. Raziskovalci so razlike med kitajsko in ostalimi populacijami pojasnili z uživanjem riža, kot enega izmed najbolj razširjenih živil pri Azijcih. Zaradi vse pogostejšega križanja med različnimi vrstami riža, so sklepali na manjšo vsebnost Zn v pridelku (56).

Tovrstne ugotovitve nakazujejo, da imajo tudi prehranjevalne navade lahko vpliv na koncentracijo Zn.

Na koncentracijo Zn v telesu lahko vpliva tudi uživanje prehranskih dopolnil. Če med seboj primerjamo študije, ki so referenčna območja postavile na serumskih vzorcih opazimo, da imajo Američani najvišjo zgornjo referenčno mejo. Ravno ameriška populacija je znana po jemanju prehranskih dopolnil in po tem, da Zn industrijsko dodajajo nekaterim živilom. Iz Amerike poročajo tudi, da je koncentracija Zn zelo visoka v nekaterih zdravilih proti prehladu, ki so zlahka dostopna v tamkajšnjih lekarnah in drogerijah (57).

Li s sodelavci navaja, da so razlike v koncentracijah Zn v različnih predelih sveta lahko delna posledica okoljskih dejavnikov in poudarja, da je potrebno še naprej raziskovati in

najti bolj specifične vzroke odstopanj (56). Vsebnost Zn v zemlji se med posameznimi evropskimi državami znatno ne razlikuje, je pa nekoliko nižja na severu (Skandinavija), kar bi lahko pojasnilo nižje referenčno območje pri Švedih (46).

Izbira referenčnih posameznikov je tudi lahko vzrok razlik. Nekatere študije namreč nakazujejo, da ključno vlogo pri koncentraciji Zn v telesu odigra spol, zato bi bilo smiselno (tako kot pri Cu) ločiti referenčna območja za moške in ženske (58, 59).

Pri Zn ugotavljamo, da imamo Slovenci največji razpon in najvišjo zgornjo mejo referenčnega območja. Razloge za to lahko poiščemo v statistični obdelavi podatkov. Če bi za iskanje ubežnikov uporabili metodo po Tukeyu, bi bilo naše referenčno območje med 654 in 1288 $\mu\text{g/L}$, kar bi zlahka lahko primerjali z referenčnimi intervali v izbranih državah. Rezultate za Zn smo pri slovenski populaciji obdelali z metodo po Reedu in ne Tukeyu, saj bi s slednjo iz statistične analize odstranili kar 12% vrednosti. Iz grafa porazdelitve podatkov za Zn je jasno razvidno, da se kar veliko vrednosti nahaja med 1100 in 1500 $\mu\text{g/L}$. Smernice CLSI v takem primeru predlagajo, da takšne vrednosti v celoti sprejmemo ali pa ubežnike obravnavamo posebej (27).

Pomembno je vedeti, da je večina absorbiranega Zn vezanega v eritrocitih (50). Pojavlja se vprašanje smiselnosti določanja Zn v plazmi, saj ga je veliko več prisotnega v polni krvi.

5.3 Kobalt

Za Co v plazmi smo na naši populaciji določili referenčno območje $< 0,65 \mu\text{g/L}$.

Nekateri znanstveniki so določili obe meji referenčnega območja za Co (Goullé pri francoski in Rodushkin pri švedski populaciji) medtem ko so se nekateri (Forrer pri švicarski) tako kot mi, določili le zgornjo mejo referenčnega intervala. Zgolj zgornji meji sta določeni tudi pri ameriški in novozelandski populaciji.

Ugotavljamo, da se podatki o referenčnih vrednostih Co v krvi in njenih pripravkih v literaturi zelo razlikujejo. Večini raziskav je tudi skupna ugotovitev, da se več Co nahaja v eritrocitih in zato serum ali krvna plazma nista najbolj primerna vzorca za določanje Co (49).

Ob primerjavi serumskih meritev opazimo, da je referenčno območje za Co pri Američanih ($< 0,90 \mu\text{g/L}$) petkrat višje kot pri Švicarjih ($< 0,16 \mu\text{g/L}$).

Kljub temu da večina Američanov s hrano dobi zadostne količine Co, jih veliko še vedno jemlje prehranska dopolnila v obliki različnih kompleksov vitamina B (60). Slednje je lahko morebitni razlog za tako veliko odstopanje. Prav tako je znano, da so visoke

koncentracije Co v zemlji predvsem posledica gnojenja kmetijskih površin s fosfatnimi gnojili, Švica pa v primerjavi z Ameriko ni izrazito kmetijska država (12).

Na koncentracijo Co lahko vplivajo tudi različna fiziološka stanja. Na Kitajskem je Liu s sodelavci analiziral serumske vzorce nosečnic in želel postaviti referenčne vrednosti za 14 elementov v sledovih med katerimi je bil tudi Co. Dobili so referenčno območje med 0,57 in 1,13 $\mu\text{g/L}$ in ugotovili, da se koncentracija Co v nosečnosti zviša, kar so pripisali presnovnim spremembam med nosečnostjo, katerih posledica je sproščanje elementov v sledovih v krvni obtok (61). Kljub uporabi iste metode te rezultate z našimi težko primerjamo; ne zgolj zaradi drugačnega vzorca, temveč tudi zaradi drugačne referenčne populacije. V našo raziskavo smo namreč zajeli domnevno zdrave krvodajalke, ki niso bile noseče.

Predanalitski dejavniki (priprava vzorca) so velikokrat vzrok različnih odstopanj. Zgornja meja intervala je pri Francozih za nekaj več kot 50% višja kot pri nas. Goullé v članku navaja, da je v študiji analiziral tudi hemolizirane vzorce plazme, ki po hemolizi niso bili centrifugirani (37). Možno je, da se je nekaj Co sprostilo iz eritrocitov, kjer je koncentracija tega elementa tudi do dvakrat višja kot v plazmi, in so zato vrednosti v njihovi študiji toliko višje.

Razhajanja med navedenimi študijami so možna tudi zaradi drugačnega vzorca (medij). Serum je sicer po sestavi zelo podoben plazmi, vendar pa je v nekaterih primerih razlika med meritvami elementov v sledovih v plazmi in meritvami v serumu še kako pomembna. Razlike med referenčnimi območji za plazmo (Slovenija, Francija, Nova Zelandija) in serum (Švedska, Švica) so lahko posledica dejstva, da so koncentracije glavnega prenašalnega proteina Co (α_2 -makroglobulin) v plazmi tudi do 11% višje kot v serumu (62).

Geografska oddaljenost je lahko vzrok razlik med slovensko in švedsko populacijo, saj se v zemlji skandinavskih držav nahaja občutno manj Co kot pri nas (44).

5.4 Krom

Določanje Cr je v preteklosti predstavljalo nemalo težav, saj je določitev zaradi zelo nizkih koncentracij tega elementa v telesu zahtevala zelo občutljive metode. Pred ICP-MS je bila metoda izbora za določanje Cr v bioloških vzorcih AAS (63).

Serumske koncentracije in referenčni intervali Cr so po svetu različni. Nekateri laboratoriji imajo referenčno območje določeno s spodnjo in zgornjo referenčno mejo, nekateri zgolj z zgornjo. Tako kot mi so tudi Američani določili samo zgornjo mejo referenčnega intervala, medtem ko so na Novi Zelandiji in Švedskem določili obe meji (39, 40).

Zaradi njegove toksičnosti so se raziskovanja Cr lotili predvsem na območjih z močno industrijo. Zanesljive referenčne vrednosti so za ljudi, ki so poklicno izpostavljeni Cr in njegovim komponentam, izjemnega pomena. Iz tega razloga je pomembno ločiti med referenčnimi območji za poklicno izpostavljene in referenčnimi območji za zdravo populacijo. Na Kitajskem so tako v provinci Shadong Cr v polni krvi analizirali kot biološki označevalec za poklicno izpostavljeno populacijo. Koncentracijo Cr v zraku so primerjali s koncentracijo Cr v krvi in določili referenčno območje. Ugotovili so, da so koncentracije Cr tako v zraku kot v krvi pri poklicno izpostavljenih posameznikih, znatno višje od zdravih (poklicno neizpostavljenih) kontrolnih skupin, in predlagali, naj bo referenčno območje za poklicno izpostavljene ljudi drugačno od tistega, ki velja za celotno populacijo ($< 20 \mu\text{g/L}$) (64). Zavezujoče biološke mejne vrednosti Cr pri poklicno izpostavljenih v Sloveniji določa Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu (65).

Laboratoriji WHO in ALS referenčno območje za Cr navajajo z obema mejama intervala (8, 66). Slednji so podatke (0,05-0,48 $\mu\text{g/L}$), ki veljajo za serum, povzeli po študiji Rodushkina in sodelavcev (40). Razlika med slovensko in švedsko populacijo je precejšnja. Pomislili smo, da je dosti nižja zgornja meja pri švedski populaciji posledica geografske oddaljenosti med državama, vendar pa vsebnost Cr v zemlji skandinavskih držav ni dosti nižja kot v Sloveniji (44).

Vpliv geografske lege zato najverjetneje velja pri primerjavi med slovensko in ameriško, pa tudi med ameriško in švedsko populacijo.

5.5 Mangan

Tudi Mn je eden istih elementov pri katerem si raziskovalci niso bili enotni glede postavitve obeh mej referenčnega območja. Francija in Švedska imata referenčno območje postavljeno z obema mejama, Američani in Švicarji pa tako kot mi – samo z zgornjo mejo. Starost preiskovancev lahko vpliva na koncentracijo Mn. Referenčno območje v Ameriki močno odstopa od skandinavskega in švicarskega referenčnega intervala. Zgornjo mejo so postavili na 2,4 µg/L, pri čemer navajajo, da so vrednosti postavili za populacijo mlajših od 18 let (42). Rügauer je s sodelavci na nemški populaciji z metodo ETAAS odkril, da koncentracija Mn s starostjo začne rahlo vpadati (67). Sklepamo, da je starostna skupina preiskovancev pri Američanih poglavitni faktor za tako odstopanje. Razlog za tako visoko postavljeno mejo v laboratorijih Mayo je morda tudi dejstvo, da je Mn eden izmed najmanj toksičnih elementov. Kaj več literature, ki bi potrdila upadanje koncentracije Mn s starostjo, nismo našli.

Kljub drugačnemu mediju večjih odstopanj med slovensko ter švedsko in švicarsko populacijo ne opazimo.

Opazna razlika je vidna med slovensko in francosko populacijo, pri kateri je referenčno območje še enkrat višje kot naše. Vzrok temu je lahko (tako kot pri Co) Goulléjeva opazka, da vzorci po hemolizi niso bili centrifugirani in sklepamo, da se je Mn sprostil iz eritrocitov in so zato koncentracije pri Francozih toliko višje.

Ugotavljamo da so referenčni intervali za Mn zelo različni, ne samo med vzorci plazme in seruma, temveč tudi med študijami, ki so bile opravljene na istem mediju. Nekatere študije v Kanadi in Braziliji so pokazale, da na koncentracijo Mn močno vpliva tudi spol (68, 69). Morebitni vzrok za takšna odstopanja je lahko koncentracija Fe v krvi. To sta skušala pojasniti Kim in Lee, ki sta na odrasli korejski populaciji ugotovila, da imajo ženske višje koncentracije Mn kot moški (70). Razlike sta sprva pripisala razlikam v koncentraciji Fe med moško in žensko populacijo (69), saj pomanjkanje Fe privede do povišane absorpcije Mn, prevalenca pomanjkanja Fe pa je višja pri ženskah kot pri moških. Njuna študija je nato pokazala, da imajo ženske z normalnimi vrednostmi hemoglobina in feritina povišan Mn. Razlike v koncentraciji Mn sta zato na koncu pripisala razliki med spoloma in razlikam v koncentracijah Fe pri obeh spolih (70).

Merjenja Mn v plazmi načeloma rutinsko ne opravljamo, saj je 85% Mn vezanega na hemoglobin v eritrocitih in je zato polna kri veliko bolj primerna za določanje statusa Mn v telesu (50).

5.6 Molibden

Za Mo v plazmi smo na naši populaciji določili referenčno območje 0,46-2,1 µg/L.

Naši rezultati za Mo se zelo dobro ujemajo z ugotovitvami Američanov, kljub pričakovanjem da bomo (zaradi uporabe istega biološkega vzorca) bolj skladni s francosko populacijo.

Če med seboj primerjamo intervale določene v serumu ugotovimo, da se območja med posameznimi državami močno razlikujejo. Daleč najnižje referenčno območje je za švedsko populacijo postavil Rodushkin (0,85 µg/L). Pričakovali smo, da se referenčna intervala za Slovence in Švede ne bosta razlikovala v takšni meri, saj je vsebnost Mo v zemlji v teh dveh državah, v primerjavi z ostalimi evropskimi državami, precej visoka (71). Razlog odstopanja je zato po vsej verjetnosti drugačen.

Forrer s sodelavci je zgornjo mejo referenčnega intervala postavil na 3 µg/L, kar je znatno višje od naše in ostalih navedenih vrednosti (41).

Podatki, ki jih je za francosko populacijo pridobil Goullé so nižji od naših: 0,67-1,68 µg/L (37).

Predvidevamo, da je glavni vzrok razlik med vsemi populacijami prehranjevanje.

V preteklosti so namreč nekatere študije nakazovale na to, da Japonci dnevno v telo vnesejo znatno višje količine Mo kot zahodne populacije. Razlog so bile njihove prehranjevalne navade, saj pojedjo veliko riža in sojinih izdelkov. Yoshida s sodelavci je ugotovil, da se serumske koncentracije Mo gibljejo med 0,1 in 9,11 µg/L in v svoji objavi kot referenčno območje za zdravo odraslo japonsko populacijo določil interval 0,1-4,73 µg/L (72). Če to vrednost primerjamo z intervalom za ameriško populacijo (0,3-2,0 µg/L) in še nekaterimi ostalimi študijami, ki so bile opravljene na ameriški populaciji (62) zaključujemo, da je interval za Mo pri japonski populaciji najširši izmed vseh. Tako kot Yoshida, tudi mi domnevamo, da so koncentracije Mo odvisne od vnosa elementa v organizem. Višja zgornja referenčna meja pri japonski populaciji je zato po vsej verjetnosti posledica višjega vnosa elementa s prehranjevanjem.

5.7 Selen

Se je en izmed tistih elementov katerega vsebnost v zemlji se v posameznih predelih sveta zelo razlikuje. Znano je tudi, da je visoka variabilnost Se v plazmi ali serumu sorazmerna z geografskim področjem (49). Najmanj tega elementa se nahaja na Kitajskem, Finskem, Novi Zelandiji in v Egiptu (6).

Med evropskimi populacijami, ki smo si jih izbrali za primerjavo, skandinavski najbolj odstopa. Po navedbah laboratorijev ALS in Rodushkinove raziskave na švedski populaciji ugotavljamo, da so vrednosti v serumu pri Skandinavcih nižje kot v Švici in ZDA. Oba vira navajata enako referenčno območje: 74-90 µg/L (40, 66). Možno je, da je nizko referenčno območje povezano prav z geografsko lego, saj je Švedska sosednja država Finske, kjer pa so koncentracije Se v zemlji med najnižjimi na svetu.

Glede na to, da se Se iz zemlje akumulira v rastlinah in posledično živalih, lahko sklepamo da se nekatera referenčna območja razlikujejo tudi zaradi prehranjevalnih navad. Opazili smo, da je referenčni interval najširši pri Američanih ter da je njihova zgornja meja območja najvišja med navedenimi v Preglednici III. Morris in Levander sta določala vsebnost Se v nekaterih ameriških živilih in ugotovila, da so koncentracije Se v žitaricah, predvsem kosmičih, zelo visoke (73). Tudi mnoga prehranska dopolnila, ki vsebujejo Se (multivitamini), so zlahka dostopna v lekarnah ali drogerijah in znano je, da Američani po uživanju prehranskih dopolnil prednjačijo pred ostalimi svetovnimi populacijami. Ravno to je morda razlog njihovega višjega referenčnega območja. Njihove meritve sicer veljajo za serum vendar sklepamo, da bi bile vrednosti v plazmi prav tako višje od naših.

Veliko Se se kopiči tudi v ribah in drugih morskih organizmih. Koncentracije plazemskega Se so višje pri ljudeh, ki uživajo veliko rib in morske hrane. Hgmar s sodelavci namreč na Latvijski populaciji ugotavlja, da je srednja vrednost Se izmerjenega v plazmi tudi do 81% višja pri ljudeh, ki jedo veliko rib (21-50 ribjih obrokov na mesec) v primerjavi s tistimi, ki v svojo dieto ne vključujejo toliko rib in morske hrane (74).

Kljub meritvam na različnih vzorcih, so ugotovitve na francoski in švicarski populaciji zelo podobne. Podobnost pripisujemo geografski bližini in podobnim prehranjevalnim navadam.

Starost močno vpliva na normalno koncentracijo Se v telesu. Razpon normalnih koncentracij Se je med 30 µg/L pri novorojenčkih in 100 µg/L pri zdravi odrasli populaciji (75).

Lymburi s sodelavci se je z isto metodo kot mi lotil določanja plazemskega Se pri avstralski populaciji in pri tem preučeval vplive spola, starosti ter kardiovaskularnih bolezni. Ugotavljamo, da je srednja vrednost pri avstralski populaciji (100.2 ± 1.3 µg/L) višja kot naša (89,85 µg/L). Pri tej študiji so tudi ugotovili, da večjih razlik v koncentraciji Se med spoloma ni. Avtorji raziskave opozarjajo, da je v tako veliki in raznoliki državi kot je Avstralija, potrebno narediti še mnogo študij, da bi lahko postavili referenčno območje, ki bi veljalo za celotno populacijo (76).

Če podatke iz Avstralije primerjamo s podatki še nekaterih študij, ki veljajo za Novo Zelandijo ugotovimo, da je razlika precejšnja. Referenčni interval za novozelandsko populacijo je v teh raziskavah med 53 in 65 µg/L in je precej nižji od avstralskega; nižji je tudi od intervala, ki velja za slovensko populacijo (77, 78).

Podatki za Novo Zelandijo iz Preglednice III veljajo za populacijo južnega otoka Nove Zelandije iz leta 1992. Znano je, da so koncentracije Se v tamkajšnjih tleh, rastlinah in živalih precej nižje kot drugod po svetu. Skladno s tem so tudi koncentracije plazemskega Se v tamkajšnji populaciji nižje. Kljub temu je pomanjkanje Se pri ljudeh na Novi Zelandiji zelo redko. Tamkajšnji raziskovalci to pripisujejo uvozu hrane, predvsem žitaric, z ostalih koncev sveta (39).

Kim in sodelavci so na podoben način kot Avstralci Se določali pri zdravih korejskih prostovoljcih. Prišli so do zaključka, da je srednja vrednost pri korejski populaciji (112.05 ± 30.42 µg/L) višja kot pri ostalih populacijah ter da so vrednosti pri ženskah višje kot pri moških. Po primerjavi z ostalimi državami po svetu so zaključili, da so koncentracije Se v korejski zemlji, vodi in hrani višje kot drugod po svetu, kar se je odrazilo v rezultatih njihove študije (79).

Ob zaključku magistrskega dela ugotavljamo, v skladu s spoznanji ostalih raziskovalcev, da na koncentracijo esencialnih elementov v telesu vplivajo številni dejavniki. Izpostavili bi vpliv geografskega področja in s tem uživanje hrane in pijače z drugačno vsebnostjo elementov. Pomembno vlogo pri koncentraciji elementov v telesu ima tudi cirkadiani ritem, saj so koncentracije nekaterih elementov višje zjutraj kot zvečer (Cu, Zn). Med primerjanjem referenčnih območij moramo biti pozorni tudi na uporabo metode in statistično obdelavo podatkov pri različnih raziskovalcih. Vrednosti določene z različno metodo, četudi v istem biološkem materialu, med seboj težko primerjamo.

Razlogi za neujemanje nekaterih referenčnih območij so lahko tudi fiziološko stanje (nosečnost), spol, starost, jemanje zdravil, stres, življenjski slog in poklicna izpostavljenost.

Prav zaradi razlik med številnimi študijami, ki so vključevale različne starostne skupine z različnih geografskih področij ter uporabljale različne tehnologije za določanje esencialnih elementov v sledovih v različnih bioloških vzorcih, je postavljanje referenčnih območij zagotovo smiselno in nujno potrebno. Raznolikost med primerjavo med različnimi Evropskimi državami je potrdila, da so rezultati naše študije zelo pomembni. Pomembna je tudi standardizacija metode s katero se lotimo določanja referenčnih vrednosti. Metoda ICP-MS namreč ni standardizirana in laboratoriji po vsem svetu zaradi tega standardizacijo načrtujejo in pripravljajo sami. Tudi to je lahko razlog nekaterih odstopanj.

Pri vsem tem se moramo zavedati, da postavitve orientacijskih referenčnih vrednosti in območij ni dokončna. Referenčna območja se namreč lahko spreminjajo in dopolnjujejo v skladu z novimi spoznanji ter uporabo novih tehnologij, statističnih pristopov in so odvisna tudi od življenjskega sloga. Iz vseh teh razlogov jih je smiselno spremljati, preverjati ter ponovno določati v smiselnih časovnih intervalih, kar priporoča tudi Inštitut za klinične in laboratorijske standarde .

6 SKLEPI

- Rezultat magistrske naloge so postavljena referenčna območja za plazemske koncentracije esencialnih elementov v sledovih (Cu, Zn, Co, Cr, Mn, Mo in Se) za slovensko populacijo. Veljajo za oba spola in različne starostne skupine odraslih.
- Dokazali smo, da referenčna območja za elemente v sledovih težko povzamemo po literaturi, saj nanje vplivajo številni dejavniki, zato je smiselno in pomembno, da vsak laboratorij postavi svoje referenčna območja za svojo populacijo in svojo metodo.
- Na novo postavljena referenčna območja za Cu, Zn, Co, Cr, Mn, Mo in Se bodo orodje za odločitve v slovenskem kliničnem okolju in so pomemben korak pri kakovostni interpretaciji rezultatov.
- Referenčni intervali postavljeni v tej magistrski nalogi bodo lahko v pomoč za prihodnje raziskave na tem področju tako v Sloveniji kot tudi v tujini.
- Zasledili smo, da so priporočila CLSI upoštevali tudi nekateri drugi raziskovalci po svetu, s čimer je bil namen priporočil, o bolj poenotenem načinu postavlja referenčnih območij, dosežen. Prav tako ugotavljamo, da je večina raziskovalcev pri statistični obdelavi uporabila neparametrično metodo, kar na splošno svetujejo tudi priporočila CLSI.
- Rezultate, ki so pridobljeni z drugimi metodami (AAS, NAA, ETAAS, FAAS) težko primerjamo z rezultati, ki smo jih dobili po analizi z ICP-MS.
- Za nekatere elemente v sledovih (Cu, Zn, Se) je na voljo veliko več literature kot za ostale.
- Potrdili smo ugotovitve ostalih raziskovalcev po svetu, da je ICP-MS učinkovita, hitra in zanesljiva metoda, ki omogoča hkratno določitev več elementov v sledovih ter je primerna za rutinsko uporabo v kliničnem laboratoriju.

7 LITERATURA IN VIRI

1. Skitek M: Najpogostejše laboratorijske preiskave in njihove orientacijske referenčne vrednosti v klinični praksi, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana
<http://m.mf.uni-lj.si/dokumenti/0a3bd1df2e66c9c75385ab17ed124de8.pdf> .
Dostopno: oktober 2017
2. Solberg HE: Establishment and use of reference values, v Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG: Tietz fundamentals of clinical chemistry, 6. izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2008: 229-237
3. Kaplan LA, Pesce AJ: Clinical chemistry: Theory, analysis, and correlation, 3. izdaja, Mosby Inc., St. Louis, 1996: 365-371
4. Štraus B: Medicinska biokemija, 2. obnovljena in dopolnjena izdaja, Medicinska naklada, Zagreb, 1992: 773-811
5. Shenkin A, Roberts NB: Vitamins and trace elements, v Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 5. izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2012: 938-965
6. Underwood E: Trace element in human and animal nutrition, 4. izdaja, Academic Press, London, 1977: 1-10
7. France-Štiglic A, Briški A: Elementi v sledovih, Zbornik predavanj, Seminar za inženirje in tehnike laboratorijske medicine, Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino, Ljubljana, 2014
8. WHO: Trace elements in human nutrition and health, Macmillan, Belgija, 1996
9. Shenkin A et al.: Vitamins and trace elements, v Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG: Tietz fundamentals of clinical chemistry, 6. izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2008: 476-508
10. Tsalev DL, Zaprianov ZK: Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice, Volume I: Analytical aspects and health significance, CRC Press, Florida, 1983: 113-127, 153-157, 169-173, 182-187, 209-214
11. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: Clinical chemistry: Principles, procedures, correlations, 5. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2005: 364-372

12. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M: Handbook on the toxicology of metals, Volume II: Specific metals, 4. izdaja, Elsevier, 2015: 717-782, 975-1005, 1077-1086, 1176-1203, 1396-1382
13. Gropper SS, Smith JL: Advanced nutrition and human metabolism, 6. izdaja, Cengage Learning, Wadsworth, 2013: 481-559
14. Allen LH: Causes of vitamin B₁₂ and folate deficiency, Food and nutrition bulletin, 2008; 29: 20-33
15. Absorption, metabolism and excretion of chromium v Committee on biologic effects of atmospheric pollutants: Chromium, National academy of sciences, Washington D.C., 1974: 35-41
16. Cerulli, J, GrabeDW, Gauthier I, et al.: Chromium picolinate toxicity, Ann Pharmacother, 1998; 32: 428-431
17. Moyer TP et al.: Toxicmetals, v Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG: Tietz fundamentals of clinical chemistry, 6. izdaja, Elsevier Saunders, St. Louis, 2008: 603-613
18. Rao AN: Trace element estimation – methods and clinical context, OJHAS, 2005; 4: 1-9
19. Bergant K: Določanje cinka v krvi pri otrocih glede na to, ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju, diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010
20. Vandecasteele C, Block CB: Modern methods for trace element determination, John Wiley&sons, Chichester, 1993: 336
21. Zega A, Žakelj S: Biomedicinska analitika I: Vaje in seminarji, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2011: 44-48
22. PerkinElmer: 30-minute guide to ICP-MS
https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74849tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf. Dostopno: julij 2017
23. Flajšman L: Validacija in merilna negotovost pri določevanju svinca in kadmija v zemlji v metodo ICP-MS, diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Celje, 2011
24. MerckMillipore, Waterfor ICP-MS,
<https://www.merckmillipore.com/INTL/en/water-purification/learning-centers/applications/inorganic-analysis/icp->

ms/_e2b.qB.s7QAAAFAniQQWTtN,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.si%2F&bd=1. Dostopno: julij 2017

25. Aytekim M, Emerk K: Accurate reference intervals are required for accurate diagnosis and monitoring of patients, University of Marmara, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Istanbul, eJIFCC, 2008; 19: 1-5
26. Gräsbeck R: Reference values, why and how, Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 1990; 201: 45-53
27. CLSI, IFCC: C28-A3 Approved guideline for defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory, 3. izdaja, 2008
28. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo: Navodilo za odvzem biološkega materiala za določanje elementov v sledovih, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, 2016
29. Higgins C: Reference intervals (2) – some practical considerations, The journal of near-patient testing and technology, 2012; 11: 12-15
30. Geffre A et al.: Reference values: A review, Veterinary clinical athology, 2009; 38: 288-298
31. Quinn MJ, Delves HT: United Kingdom blood lead monitoring programme 1984-1987: protocol and results for 1984, Hum Toxicol, 1987; 6: 459-474
32. Pocock SJ, Delves HT, et al.: Blood cadmium concentrations in the general population of British middle aged men, Hum Toxicol, 1988; 7: 95-103
33. Iversen BS, Menne C, et al.: Inductively coupled plasma and spectrometric determination of molybdenum in urine from a Danish population, Analyst, 1998; 123: 81-86
34. Bárány E, Bergdahl IA, et al.: Trace elements in blood and serum of Swedish adolescents: Relation to gender, age, residential area, and socioeconomic status, Environmental research - section A, 2002; 89: 72-84
35. Apostoli P, Minola C, Hamilton HI: Significance and utility of reference values in occupational medicine, The science of the total environment, 1998; 209: 69-77
36. Minoia C, Sabbioni E, et al.: Trace element Reference values in tissues from inhabitants of the European Community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects, The science of the total environment, 1990; 95: 89-105

37. Goullé JP, Mahieu L, et al.: Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair reference values, *Forensic science international*, 2005; 153: 39-44
38. White MA, Sabbioni E: Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union X. A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population, *The science of the total environment*, 1998; 216: 253-270
39. Labnet test manager, <http://www.labnet.health.nz/labnet/index.php>. Dostopno: januar 2018
40. Rodushkin I, Ödman F, et al.: Multi-element analysis of body fluids by double-focusing ICP-MS, *Pure and applied chemistry*, 2001; 5: 51-66
41. Forrer R, Gautschi K, Lutz H: Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS, *Biological trace element research*, 2001; 80: 77-93
42. Mayo medical laboratories: Test Catalogue
<https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/index.html>.
Dostopno: oktober 2017
43. Versieck J, Cornelis R: Normal levels of trace elements in human blood plasma or serum, *AnalyticaChimica*, 1980; 116: 217-254
44. Albanese S, Sadeghi M, Lima A et al.: GEMAS: Cobalt, Cr, Cu and Ni distribution in agricultural and grazing land soil of Europe, *Journal of geochemical exploration*, 2015; 154: 81-93
45. Tóth G, Hermann T et al.: Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment, *Science of the total environment*, 2016; 565: 1054-1062
46. Tóth G, Hermann T et al.: Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety, *Environment international*, 2016; 88: 299-309
47. Fishel FM: Pesticide toxicity profile: Copper-based pesticides, University of Florida, 2014
48. Stanley PC, Okeke E, Ukoli C: Trace elements profile among alcohol abusers in a Nigerian community, *Journal of applied sciences and environmental management*, 2007; 11; 45-46

49. Caroli S et al.: The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review, *Critical reviews in analytical chemistry*, 1994; 24: 363-398
50. Bocca B, Madeddu R et al.: Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population, *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2011; 25: 19-26
51. Martin-Lagos F, Navarro-Alarcon M et al.: Zinc and copper concentrations in serum from Spanish women during pregnancy, *Biological trace element research*, 1998; 61: 61-70
52. Beneš B et al.: The concentration levels of Cd, Pb, Hg, Zn and Se in blood of the population in the Czech Republic, *Central European journal of public health*, 2000; 8: 117-119
53. Krause C, Bobisch W et al. Umwelt survey 1990/92: Studienbeschreibung und Human-Biomonitoring deskription der Spurenelementgehalte in Blut und Urin der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland, Institut für Wasse-, Boden- und Lufthygiene des Umweltbundesamtes, Berlin, 1996
54. Lifschitz MD, Henkin RI: Circadian variation in copper and zinc in man, *Journal of applied physiology*, 1971; 31: 88-92
55. Iyengar GV: Concentrations of 15 trace elements in some selected adult human tissues and body fluids of chemical interest from several countries: results from a pilot study for the establishment of reference values, *Report of the nuclear research center*, 1985
56. Li L, Xu G, et al.: Analysis of blood concentrations of zinc, germanium, and lead and relevant environmental factors in a population sample from Shandong province, China, *International journal of environmental research and public health*, 2017; 14: 227
57. U.S. Department of health and human services, National Institutes of health: Zinc – Fact sheet for health professionals, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>. Dostupno: februar 2018
58. Chia S-E, Ong C-N et al.: Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men, *Journal of Andrology*, 2000; 21: 53-57
59. Lewis-Jones DI, Aird IA et al.: Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma, *Human Reproduction*, 1996; 11: 2456-7

60. U.S. Department of health and human services, National Institutes of health: Vitamin B, <https://ods.od.nih.gov>. Dostopno januar 2018
61. Liu X, Zhang Y, et al.: Reference values of 14 serum trace elements for pregnant Chinese women: A cross-sectional study in the China nutrition and health survey 2010-2012, *Nutrients*, 2017; 9
62. Witt I, Tritschler W: α_2 -macroglobulin in serum and plasma: reference values with carbobenzoxy-valyl-glycyl-arginine-p-nitroanilide, a chromogenic substrate, *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 1983; 21: 429-436
63. Milne DB: Laboratory assessment of trace element and mineral status, v Bogden JD, Klevay LM: *Clinical nutrition of the essential trace elements and minerals*, 1. Izdaja, Humana Press Inc, New York, 2000: 69-90
64. Li P, Li Y, et al.: Establishment of a reference values for chromium in the blood for biological monitoring among occupational chromium workers, *Toxicology and industrial health*, 2016; 32; 1737-44
65. Uradni list RS št. 100/01: Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu, Priloga 2
<https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2001-01-4905?sop=2001-01-4905>. Dostopno: oktober 2017
66. ALS Scandinavia; Reference data biomonitoring, Trace elements in human biological material, https://www.alsglobal.se/mediase/pdf/reference_data_biomonitoring_1_20710.pdf. Dostopno: oktober 2017
67. Rügauer M, Klein J, Kruse-Jarres JD: Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium, and zinc in the serum/plasma of children, adolescents, and adults, *Journal of trace elements in medicine and biology*, 1997; 11; 92-98
68. Clark NA, Tescheke K et al.: Trace element levels in adults from the west coast of Canada and associations with age, gender, diet, activities, and levels of other trace elements, *Chemosphere*, 2007; 70: 155-164
69. Baldwin M, Mergier D et al.: Bioindicator and exposure data for a population based study of manganese, *Neurotoxicology*, 1999; 20: 343-353
70. Kim Y, Lee BK: Iron deficiency increases blood manganese level in the Korean general population according to KNHANES 2008, *Neurotoxicology*, 2011; 32: 247-254

71. Cicchella D, Zuzolo D et al.: GEMAS: Molybdenum spatial distribution patterns in European soil, European geosciences union, Geophysical research abstracts, 2017; 19
72. Yoshida M, Ôta S, Fukunaga K, Nishiyama T: Serum molybdenum concentration in healthy Japanese adults determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2006; 20: 19-23
73. Morris VC, Levander OA: Selenium content in foods, *The journal of nutrition*, 1970; 100: 1383-1388
74. Hagmar L, Persson-Moschos M et al.: Plasma levels of selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase and their correlations to fish intake and serum levels of thyrotropin and thyroid hormones: a study on Latvian fish consumers, *European journal of clinical nutrition*, 1998; 52: 796-800
75. Platin LO, Mauerling S: The concentration of trace elements in blood from healthy newborns v Brätter P, Schramel P: *Proceedings of trace element analytical chemistry in medicine and biology*, Berlin, 1980, 243 356: 233-241
76. Lymbury R, Tinggi U, et al.: Selenium status in Australian population: Effect of age, gender and cardiovascular disease, *Biological trace element research*, 2008; 126: 1-10
77. Thomson CD, Robinson MF, et al.: Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase in blood components of New Zealand women, *British journal of nutrition*, 1993; 69: 577-588
78. Duffield AJ, Thomson CD: A comparison of methods of assessment of dietary selenium intakes in Otago, New Zealand, *British journal of nutrition*, 1999; 82: 131-138
79. Kim YJ, Galindey O, Sei JH: Serum selenium level in healthy Koreans, *Biological trace element research*, 2009; 131: 103-109