

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie

Lucie Jiráková

**Stanovení selenu a manganu v likvoru
atomovou absorpční spektrometrií**

Bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Lucie Jiráková**

Vedoucí práce: **Ing. Karel Kotaška, Ph.D.**

Oponent práce: **Ing. Eva Klapková, Ph.D.**

Datum obhajoby: **28. 5. 2014**

Bibliografický záznam

JIRÁKOVÁ, Lucie. *Stanovení selenu a manganu v likvoru atomovou absorpční spektrometrií*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2014. 64 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

Anotace

Cílem práce bylo posoudit vhodnost použití atomové absorpční spektrometrie pro stanovení selenu a manganu v likvoru a stanovit koncentrace Se a Mn ve vybraném souboru pacientů. Pro selen byla stanovena mez detekce 2,9 µg/l a pro mangan 0,26 µg/l.

Bylo vyšetřeno 73 pacientů (31 žen, 42 mužů), jejichž průměrný věk činil 14,1 let. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle věku (56 dětí, 17 dospělých) a do dvou podskupin podle diagnóz (onkologické, neurologické). Kontrolní skupinu tvořilo 18 jedinců (5 žen, 13 mužů, průměrný věk 21,7 let) s neonkologickými a neneurologickými diagnózami.

Prokázali jsme statisticky významně zvýšené koncentrace selenu v likvoru v kontrolní skupině oproti skupině neurologické (medián = 14,4 µg/l vs. 12,4 µg/l, $p < 0,05$). Zvýšené hladiny manganu v likvoru jsme zaznamenali v dětské skupině s onkologickými onemocněními v porovnání s kontrolní skupinou pacientů (1,2 µg/l vs. 0,5 µg/l, $p < 0,05$).

Stanovení selenu a manganu v likvoru může být diagnosticky významné u vybraných skupin pacientů.

Klíčová slova

selen; mangan; likvor; atomová absorpční spektrometrie; neurologie; onkologie

Annotation

The aim of this study was to confirm the use of electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of selenium and manganese in the cerebrospinal fluid and to investigate concentrations of selenium and manganese in selected group of patients. For selenium was determined the detection limit 2,9 µg/l, for manganese 0,26 µg/l.

73 patients were examined (31 women, 42 men) whose average age was 14,1 years. The patients were divided into two groups according to age (56 children, 17 adults) and into two subgroups according to diagnoses (oncological, neurological). The control group consists of 18 subjects (5 women, 13 men, average age 21,7 years) with non-oncological and non-neurological diagnoses.

We found significantly increased selenium concentrations in cerebrospinal fluid in the control group, compared with the group with neurological diagnoses (median = 14,4 µg/l vs. 12,4 µg/l, $p < 0.05$). Elevated levels of manganese in cerebrospinal fluid was observed in a group of children with oncological diseases compared with control group (1,2 µg/l vs. 0,5 µg/l, $p < 0.05$).

Determination of selenium and manganese in the cerebrospinal fluid may have diagnostic importance in selected groups of patients.

Keywords

selenium; manganese; cerebrospinal fluid; atomic absorption spectrometry; neurology; oncology

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Karla Kotašky, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu této bakalářské práce Ing. Karlovi Kotaškovi, Ph.D. za odborné rady a vedení této práce. Také děkuji Mgr. Romaně Pospíšilové za technickou pomoc při měření v laboratoři.

OBSAH

ÚVOD.....	7
1 STOPOVÉ PRVKY V ORGANISMU	8
1.1 PŘEHLED STOPOVÝCH PRVKŮ A JEJICH VÝZNAM V ORGANISMU.....	10
1.1.1 Esenciální stopové prvky	10
1.1.2 Ultrastopové prvky.....	22
1.1.3 Toxické prvky	23
1.2 INDIKACE K VYŠETŘENÍ STOPOVÝCH PRVKŮ	24
1.2.1 Preamalytická fáze	24
1.2.2 Vyšetřovaný materiál	24
2 METODY STANOVENÍ STOPOVÝCH PRVKŮ	26
2.1 ATOMOVÁ ABSORPČNÍ FOTOMETRIE	26
2.2 INSTRUMENTACE V AAS	27
2.3 PRACOVNÍ TECHNIKY AAS	29
2.3.1 Plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (FAAS)	30
2.3.2 Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS)	30
2.3.3 Hydridová technika (HG-AAS)	32
2.4 ZDROJE CHYB V AAS	32
2.4.1 Nespecifická absorpce	33
2.4.2 Interference	36
3 CÍLE PRÁCE	38
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4 CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ, MATERIÁL A METODY	39
4.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ	39
4.2 STANOVENÍ SELENU	39
4.3 STANOVENÍ MANGANU.....	41
4.4 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	42
4.5 CHARAKTERISTIKA METODY ETA-AAS NA MĚŘENÍ SE A MN	42
4.6 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	43
5 VÝSLEDKY	44
5.1 OVĚŘENÍ MOŽNOSTI STANOVENÍ SELENU A MANGANU.....	44
Stanovení meze detekce Se	44
5.2 VÝSLEDKY STANOVENÍ KONCENTRACE SE A MN U PACIENTŮ	47
6 DISKUZE.....	50
ZÁVĚR.....	55
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58

ÚVOD

Selen a mangan patří mezi významné stopové prvky podílející se na řadě biochemických dějů. Jsou součástí nejdůležitějších antioxidantních enzymů (hydroláz a metaloproteináz), které se podílejí na širokém spektru ochranných procesů v organismu. Narušení antioxidantní rovnováhy v důsledku oxidačního stresu hraje důležitou roli v patogenezi řady chorob včetně nádorů, proto je nezbytné vyšetřovat koncentraci selenu a manganu v různých biologických materiálech.

Ve své práci se budu věnovat stanovení selenu a manganu v likvoru. Stanovení Se a Mn v likvoru není v laboratořích běžně prováděno, v literatuře však lze nalézt studie, které se stanovením koncentrací stopových prvků v mozkomíšním moku zabývají [52; 53; 60; 61; 62].

Cílem práce je posoudit možnost stanovení selenu a manganu v likvoru metodou atomové absorpční spektrometrie ověřením meze detekce, stanovit koncentraci Se a Mn ve vybraných skupinách pacientů (pacienti s nádorovými onemocněními, pacienti s neurologickými onemocněními) a provést porovnání výsledků s výsledky jiných studií.

TEORETICKÁ ČÁST

1 STOPOVÉ PRVKY V ORGANISMU

Stopové prvky, někdy nazývané jako mikroelementy, mikroprvky či mikronutrienty, jsou biologicky účinné anorganické látky, které nacházíme ve vodách a půdách, odkud je také získáváme. V přírodě se vyskytují ve formě solí [7, s. 8]. Jiná definice říká, že se jedná o prvky, jejichž množství nepřesahuje 50 mg/kg tkáně, tedy 0,01 % tělesné hmotnosti [1, s. 287].

Přesto, že se v našem těle stopové prvky vyskytují ve velmi nízkých hodnotách a nejsou nositeli energie, jsou nezbytné pro správné fungování řady metabolických procesů. Stopové prvky nemohou být v těle samy vytvářeny a musejí být přijímány potravou [7, s. 8; 9].

V současné době je známo více než 30 stopových prvků. Jejich klasifikace však není v literatuře jednotná. Předkládaná práce využívá třídění dle Chromého a kol. Autoři řadí železo, jod, měď, zinek, kobalt, chrom, selen, fluor, mangan, nikl mezi prvky esenciální a arsen, křemík a vanad mezi prvky neesenciální [1, s. 287; 4, s. 8; 44, s. 330].

Esenciální prvky jsou ty, které organismus potřebuje nejen pro svůj normální růst a zdravý vývoj, ale také pro svou reprodukci, když všechny ostatní výživové faktory jsou optimální [4 s. 12]. Esenciální stopové prvky jsou nepostradatelné pro organismus [6, s. 8].

Neesenciální stopové prvky nemají v lidském těle přirozené fyziologické účinky a obvykle se v něm ani nevyskytují. Patří k nim, kromě tří výše uvedených, také hliník, bismut, zlato, stříbro či lithium [8].

Obrázek 1 znázorňuje umístění stopových prvků v periodické tabulce.

Obrázek 1. Stopové prvky v periodické tabulcePřevzato z <<http://2012books.lardbucket.org>> [47].

		Esenciální stopové prvky										Prvky pravděpodobně esenciální pro člověka					Neesenciální stopové prvky	
1	2											13	14	15	16	17	18	
1	2											5	6	7	8	9	10	
3	4											13	14	15	16	17	18	
11	12											13	14	15	16	17	18	
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	
87	88	89	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115				
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Uub	Uut	Uuq	Uup				

Stopové prvky se dají rozdělit i na základě jejich biologických funkcí na:

- *esenciální s definovanou denní dávkou*, např. selen, jod, železo, zinek
- *esenciální, ale bez přesného stanovení denní dávky*, např. mangan, měď, fluor, chrom, kobalt, molybden
- *ultrastopové* (vyskytují se ve tkáni řádově v $\mu\text{g}/\text{kg}$), u nichž zatím nebylo jasně určeno, zda jsou v určitých koncentracích esenciální či škodlivé a nebyla tedy jasně definována ani jejich role v organismu, např. lithium, bor, nikl, vanad, křemík, cín [9; 10]
- *toxické*, jejichž biologická funkce není u lidí známa, ale které i v nízkých koncentracích způsobují patologické změny, např. rtuť, arsen, kadmium, olovo, hliník [9].

Esenciální stopové prvky se podílejí na řadě biochemických dějů. V enzymových systémech působí jako kofaktory, nebo jako součásti metaloenzymů či metaloproteinů. Hrají důležitou úlohu v metabolismu celé řady živin. Jsou součástí buněčných struktur membrán a DNA. Uplatňují se při ochraně organismu před oxidačním stresem. Některé stopové prvky hrají klíčovou roli v regulaci imunitního systému [9; 11; 44, s. 333].

Pokud není lidský organismus dostatečně zásoben některým z těchto prvků, dochází k funkční poruše na buněčné úrovni. Nedostatek stopových prvků v lidském těle může být zapříčiněn například omezeným příjmem potravou, malabsorpcí,

alkoholismem, poruchami pankreatu, nádory duodena, zánětlivými onemocněními střev. Dlouhodobý deficit je spojen se závažnými následky. Vzhledem k množství a funkcím stopových prvků jsou projevy deficitu velmi rozdílné a často nespecifické [44, s. 333].

Přehled stopových prvků jako kofaktorů izoenzymů je znázorněn v tabulce 1.

Tabulka 1. Stopové prvky jako kofaktory enzymů; upraveno dle [44].

ENZYM	STOPOVÝ PRVEK								
aminopeptidázy					Mg	Mn			
aldehydoxidáza			Cu				Mo		
alkalická fosfatáza									Zn
argináza	Ca				Mg	Mn			
karboxypeptidáza A		Co		Fe		Mn		Ni	Zn
karboxypeptidáza B		Co							Zn
cytochrom C oxidáza		Co	Cu						
enoláza				Fe		Mn			Zn
dipeptidázy	Ca				Mg			Ni	
glukokináza	Ca	Co			Mg	Mn			Zn
glutamátdehydrogenáza									Zn
laktátdehydrogenáza								Ni	
malátdehydrogenáza								Ni	
NADP cytochromreduktáza				Fe					
nukleosidfosforyláza									Zn
sukcinátdehydrogenáza				Fe					
fosfatázy	Ca		Cu	Fe	Mg			Ni	Zn
tyramináza			Cu						
tyrosináza			Cu						
urikáza			Cu						
xantinoxidáza			Cu				Mo		

1.1 Přehled stopových prvků a jejich význam v organismu

1.1.1 *Esenciální stopové prvky*

Železo (Fe)

Železo zaujímá v dospělém lidském těle asi 40 - 50 mg na 1 kg tělesné hmotnosti. Množství Fe v organismu závisí na věku, pohlaví, hmotnosti, stavu výživy [4, s. 44].

Železo je součástí hemu, který je základním výchozím produktem pro tvorbu červeného krevního barviva hemoglobinu. Hemoglobin ve své molekule obsahuje kromě čtyř molekul kyslíku také čtyři molekuly hemu. Fe^{2+} spojením s hemoglobinem a myoglobinem slouží k přenosu kyslíku v krvi [25, s. 410].

Nejvíce železa je obsaženo v myoglobinu, transferinu a laktoferrinu [25, s. 410].

Fe je absorbováno v horní části tenkého střeva. Z železa vázaného na hem je vstřebáno více než 20 %, z volného železa se vstřebávají jen asi 3 %. Malé množství železa je vylučováno žlučí [25, s. 409].

Železo je součástí mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce cytochromoxidázy, sukcinátdehydrogenázy, NADH dehydrogenázy, mitochondriálních cytochromů a enzymů účastnících se syntézy DNA [25, s. 410; 48].

Transport železa je uskutečňován prostřednictvím plazmatické bílkoviny transferinu. Z hodnoty transferinu je možné zjistit celkovou vazebnou kapacitu železa. Železo je v organismu skladováno v retikuloendoteliálním systému kostní dřeň, játrech, a slezině, v menší míře je obsaženo ve feritinu a hemosiderinu [25, s. 410].

Koncentraci železa v organismu můžeme stanovit vyšetřením koncentrace Fe v séru, případně vyšetřením koncentrací feritinu, transferinu, hemoglobinu a erytrocytů. K laboratorním vyšetřením patří i stanovení transferinového receptoru v séru [25, s. 410].

Pokles hladiny železa v krvi tlumí růst bakterií. Naopak zvýšené hladiny zvyšují účinnost některých bakterií [46, s. 200].

Deficit železa je nejčastějším výživovým deficitem. Hyposideremie neboli nedostatek Fe může být zapříčiněn nevyváženou, na železo chudou stravou, krvácením, poruchou resorpce. Může se objevit i u maligních nádorů a chronických zánětů [1, s. 287; 25, s. 410].

Fyziologicky dochází ke ztrátám železa u žen při menstruaci. Hyposideremie může vyústit v anemii, charakterizovanou bledostí, únavou, dušností, sníženou imunitou a změnami v trávicím ústrojí. Zvýšený příjem železa je nutný v těhotenství [6, s. 64].

Potraviny s vyšším obsahem železa jsou živočišné produkty včetně masa a vnitřností, špenát [6, s. 64; 7, s. 84].

K hypersideremii, neboli nadbytku železa, dochází u lidí s hemochromatózou, dědičným onemocněním spojeným s poruchou absorpce železa a jeho následnou akumulací v játrech, pankreatu, srdci a dalších orgánech. K příznakům intoxikace

dochází, přesahuje-li koncentrace plazmatického Fe jeho vazebnou kapacitu [4, s. 49; 46, s. 201].

Toxické účinky byly pozorovány i u lidí s nadměrným požíváním potravinových doplňků obsahujících železo a objevily se i při opakovaných transfuzích v důsledku nadbytečného ukládání železa v organismu. Tento stav je označován jako hemosideróza [25, s. 411].

Jod (I)

Jod je v celkovém množství 15-20 mg přítomen převážně ve štítné žláze. Menší množství se nachází ve slinách. Vstřebaný jod z tenkého střeva je vychytáván štítnou žlázou a použit pro syntézu tyreoglobulinu. Vylučován je převážně močí [13; 25, s. 413].

Jod je potřebný pro tvorbu hormonů štítné žlázy trijodtyroninu (T_3) a tyroxinu (T_4), které ovlivňují metabolické aktivity a jejich dostatečný příjem je neodmyslitelně spjat se správným vývojem kostí a centrálního nervového systému během fetálního i postnatálního vývoje. Thyroidní hormony dále regulují mnohé důležité biochemické reakce, včetně syntézy bílkovin a enzymatické aktivity [4, s. 60; 13].

Koncentraci jodu v organismu můžeme vyšetřit stanovením jodu v moči, případně můžeme stanovit koncentraci jodu vázaného v organismu ve formě thyreoidálních hormonů T_4 a T_3 , případně tyreotropního hormonu (TSH). Pokud je příjem jodu nízký, koncentrace TSH stoupá a koncentrace periferních hormonů (fT3 a fT4) klesají [25, s. 413].

Deficit jodu se může projevit zvětšením štítné žlázy, tzv. strumou v důsledku snížené funkce štítné žlázy, kdy štítná žláza nevytváří dostatečné množství hormonů. Hypotyreóza u těhotných žen představuje vysoké riziko vrozených vad, mentální retardace a poruch růstu plodu [12].

Opačný případ, kdy štítná žláza produkuje nadbytek hormonů, se nazývá hypertyreóza. Její nejčastější příčinou je Graves-Basedowova choroba, ale může to být také nadměrný přísun jodu, tyreoiditida a další [14].

Jod se přirozeně vyskytuje v některých potravinách. Půdy po celém světě se však značně liší v množství jodu, které obsahují, tedy i plodiny na nich vypěstované se v tomto množství značně odlišují. Některé oblasti jsou postiženy trvalým nedostatkem jodu. Vzhledem k často se vyskytujícímu jodovému deficitu

se začala jodem obohacovat kuchyňská sůl a některé další potraviny. Nejlepšími zdroji jodu ale zůstávají mořské ryby, mořské plody, játra a hrách [13].

Měď (Cu)

Celkové množství mědi v organismu je asi 100 mg. Převážná většina (95 %) mědi je navázána na transportní bílkovinu ceruloplazmin, zbytek na albumin. Absorpce mědi probíhá v žaludku a duodenu a je regulována množstvím metalothioneinu v buňkách střeva. Měď je vylučována žlučí. Nejvyšší koncentrace mědi je v játrech [25, s. 406]. V literatuře jsou uváděny hodnoty v rozmezí 0,3 - 0,8 $\mu\text{mol/g}$ jaterní tkáně, nebo 20 - 50 $\mu\text{g/g}$ jaterní tkáně [49].

Měď je ve tkáních navázána na metaloenzymy a metaloproteiny. Je součástí řady enzymů, konkrétně oxidáz (např. cytochromoxidáza, která hraje roli v transportu kyslíku, ferroxidáza katalyzující oxidaci dvojmocného železa na trojmocné, lyzyloxydáza zajišťující pevnost vazivové tkáně), hydroláz a superoxiddismutáz. Superoxiddismutáza je důležitá v obraně proti volným radikálům.

Cu se podílí na tvorbě melaninu, metabolismu glukózy, cholesterolu a železa a je důležitým antioxidantem imunitního systému [15, s. 61; 1, s. 287; 6, s. 66-68; 25, s. 407].

Po úrazech hodnoty kupremie a ceruloplazminu stoupají [45, s. 203].

Deficit mědi může vzniknout v důsledku nedostatečného přívodu potravou, malabsorpce, dále také při dlouhodobé parenterální výživě či nadměrném příjmu zinku nebo železa. S nedostatkem Cu se setkáváme u popálenin, familiární hypokupremie a Menkesovy choroby [25, s. 407; 44, s. 337; 45, s. 203].

Menkesova nemoc je vrozená porucha metabolismu mědi, kdy se setkáváme s jejím deficitem v důsledku snížené absorpce mědi, zvýšeného vylučování močí a abnormálním transportem v buňkách.

Vzhledem k tomu, že zabudování železa do hemoglobinu je závislé na přítomnosti mědi, její nedostatečný příjem může mít za následek vznik mikrocytární hypochromní anemie. Nedostatečný příjem mědi může být také asociován s osteoporózou.

Deficit mědi u dětí vede ke zpomalení růstu a mentálního vývoje, doprovázenému poruchami pigmentace, narušenou elasticitou tepen, hypertrofií a fibrózou myokardu. Zvyšují se sérové hladiny cholesterolu, triacylglycerolů a fosfolipidů. Je narušena tvorba inzulinu a tolerance glukózy [6, s. 67; 25, s. 407].

Akutní intoxikace může být vyvolána vdechováním prachu s obsahem mědi. Projevuje se kašlem, bolestí hlavy, teplotou, třesavkou a malátností [25, s. 407].

Toxické účinky mědi se projevují u choroby označované jako Wilsonova nemoc. Při Wilsonově nemoci se měď v důsledku omezené vazby na ceruloplazmin hromadí v mozku, játrech, ledvinách a rohovce, a vyvolává nekrózu buněk [6, s. 67-68; 25, s. 407].

Typické laboratorní nálezy u Wilsonovy choroby jsou snížené sérové koncentrace ceruloplazminu a mědi. Může však být i normální nebo zvýšená. V případě, že je v séru naměřena zvýšená hladina Cu, jedná se o toxickou měď. V moči nacházíme zvýšené hodnoty, ve stolici snížené [25, s. 407].

Dobrymi zdroji mědi jsou luštěniny, celozrnné pečivo, vepřová a hovězí játra, ořechy a mořské produkty [6, s. 67; 7, s. 50].

Autoři Brodská a kol. zmiňují antimikrobiální účinky mědi. Výsledky z mikrobiologické studie, provedené na oddělení jednotky intenzivní péče, prokázaly, že měděné povrchy předmětů běžného vybavení jsou daleko méně kontaminovány mikroby, než jakékoliv jiné povrchy těch samých předmětů [45, s. 203].

Kobalt (Co)

Kobalt je dle některých literárních pramenů [1; 4; 9; 44] řazen mezi esenciální stopové prvky. Je součástí kobalaminu (vitaminu B₁₂). Vitamin B₁₂ napomáhá při tvorbě erytrocytů, zlepšuje příjem jodu ve štítné žláze a je důležitý pro některé enzymy. Co se účastní tvorby erythropoetinu a působí jako vazodilatans. Je také kofaktorem řady enzymatických reakcí, zahrnujících působení cytochromoxidázy, superoxididizmutázy a urikázy.

Příčinou deficitu kobaltu může být jeho kompetice se železem a manganem během absorpce v tenkém střevě, nebo dlouhodobý deficit kobalaminu. Deficit Co je spojen se vznikem perniciózní anemie, dále s hubnutím, nechutenstvím, únavou a zpomalením růstu.

Nejvydatnějšími zdroji kobalaminu jsou maso, vnitřnosti, listová zelenina, vejce a mléčné výrobky.

Kobalt se dříve přidával do piva. Při nadměrném pití piva se u některých jedinců projevil toxické účinky kobaltu v podobě kardiomyopatií. Zvýšené koncentrace kobaltu jsou spojovány se zvětšením štítné žlázy blokováním příjmu jodu kobaltem [7, s. 40; 4, s. 75-76; 25, s. 413; 44, s. 336].

Fluor (F)

Příjem fluoru je zajištěn nejen potravou, ale i pitnou vodou a minerálními vodami. Přijatý fluor se absorbuje v žaludku a tenkém střevě a jeho exkrece je zajištěna hlavně močí [25, s. 414].

Fluor tvoří s ostatními prvky nerozpustné soli. Důležitý je pro stavbu kostí a zubů, kde se nachází ve formě fluoroapatitu. Fluor na zubech zčásti zabraňuje růstu bakterií. Ve formě fluoridů pak podporuje osteoblasty k tvorbě osteoidu [25, s. 414].

Nedostatek může být způsoben deficitem fluoru v pitné vodě. Klinicky se projevuje zvýšenou kazivostí zubů a kalcifikací kostí [7, s. 17; 25, s. 414].

Akutní intoxikace je doprovázena křečemi, hemorragií, sliněním, pocením, sníženou krevní srážlivostí.

Chronická intoxikace může nastat při vdechování prachu s obsahem fluoru nebo při po dlouhodobějším požívání vody a potravin bohatých na fluor. Na kostech se projevuje dekalifikací, lomivostí, na zubech se objevují téměř černé skvrny [25, s. 414].

Molybden (Mo)

Nejvyšší obsah molybdenu je v játrech, ledvinách a slezině. Jeho zásoby se od dvacátého roku života snižují. V krvi se nachází především ve formě iontů a vylučován je hlavně močí, méně žlučí [25, s. 413].

Molybden je kofaktorem enzymů, např. xantinoxidáza, aldehydoxidáza a sulfitoxidáza, které jsou důležité pro metabolismus pyrimidinu, purinu a vznik kyseliny močové. Xantinoxidáza přeměňuje hypoxantin pomocí xantinu na kyselinu močovou. Molybden tvoří součást flavoproteinů [1, s. 288; 6, s. 75; 44, s. 343].

Při dlouhodobé parenterální výživě může dojít k deficitu molybdenu. Může se projevit jako zvracení, tachykardie, mentální poruchy, vady zraku, kóma [25, s. 413; 44, s. 342].

Deficit molybdenu je spojen s poměrně vzácným onemocněním, xanthinurií, vrozenou chorobou, projevující se hypourikemií a zvýšeným vylučováním xantinu močí a tvorbou kamenů. Příčina onemocnění je však neznámá [44, s. 342].

Zvýšené hladiny molybdenu se objevují na počátku virové hepatitidy a u řady hepatobiliárních onemocnění, např. hepatitidy, cirhózy, poškození jater alkoholem nebo léky, metastázy, obstrukce žlučového nebo rakoviny pankreatu [44, s. 343].

Molybden se stanovuje převážně v moči [44, s. 342].

Mléčné produkty, telecí játra, luštěniny, zelenina, kokos a obilí jsou důležité zdroje molybdenu. Jsou však závislé na kvalitě půdy [44, s. 343].

Zinek (Zn)

Zinek je stopový prvek, který tvoří nepostradatelnou součást asi 250 enzymů. Mezi enzymy obsahující zinek patří například superoxiddizmutázy, alkalické fosfatázy, karbohydrázy, ligázy, transferázy, izomerázy, polymerázy, reverzní transkriptázy, laktátdehydrogenázy a alkoholdehydrogenázy.

V těle je zinek přítomen v množství 2 - 2,5 g. V krvi je vázán na albumin a alfa-2-makroglobulin. Je součástí erytrocytů. Jeho absorpce je negativně ovlivněna množstvím přiváděného železa, mědi, vlákniny a fytátů. Ve tkáních je vázán na metalothionein. Zn je vylučován převážně stolicí, v menší míře močí [4, s. 52; 25, s. 405].

Zn je důležitý pro funkci imunitního systému, syntézu a konformaci bílkovin a s tím související hojení ran, pro udržení celistvosti kůže a také pro tvorbu inzulinu. Podporuje zdravý růst a vývoj během těhotenství, dětství i dospívání. Tzv. „zinkové prsty“ mají význam při regulaci genové exprese. Jejich proteiny mohou fungovat jako transkripční faktory [6, s. 65; 13; 25, s. 405; 46, s. 198].

Vzhledem k tomu, že si naše tělo nevytváří zásoby zinku, musí být denně přijímán potravou v dostatečném množství. Nejvydatnějšími zdroji jsou obilniny, výrobky z obilí, ústřice a tmavé maso [6, s. 65; 13].

Zinkemie klesá při reakci akutní fáze a její změny by se měly porovnávat s hodnotami albuminu a C-reaktivního proteinu. V kritických stavech je také popisován pokles zinkemie a zvýšené vylučování močí [25, s. 405; 46, s. 198].

Deficit zinku může být zapříčiněn nedostatečným příjmem v potravě, poruchou resorpce, př. u celiakie, dále zvýšenými ztrátami zinku u popálenin, traumat. V možném riziku jsou i těhotné ženy, lidé trpící alkoholismem či lidé s malnutricí [25, s. 405, 406].

Nedostatek zinku se projevuje řadou příznaků, ale velmi často to bývají různé záněty, průjem, poruchy čichu a chuti. Ve vážnějších případech se můžeme setkat s vypadáváním vlasů, opožděným sexuálním vyzráváním či hypogonadismem u mužů. Je však nutné si uvědomit, že řada těchto příznaků není specifická, a je nutné, aby lékař vždy ověřil, zda se jedná skutečně o nedostatek zinku, nebo zda je příčina těchto změn jiná [6, s. 66; 13].

Je známa také vrozená porucha resorpce a transportu zinku (*akrodermatitis enterohepatica*), která je ale úspěšně léčena obohacováním stravy o zinkové preparáty. Charakteristickým projevem jsou hyperpigmentované kožní léze na kolenech, loktech, často i tvářích. Laboratorně se projevuje snížením hladiny zinku v séru, poklesem syntézy bílkovin a kolagenu [6, s. 66; 25, s. 406].

Toxicita zinku je poměrně nízká a k předávkování zinkem dochází pouze ojediněle, např. při požití oxidu zinečnatého. Otravy zinkem se při jeho nadměrném přísunu do organismu, nejčastěji vdechováním par nebo prachu s jeho obsahem, projevují nevolností, zvracením, ztrátou chuti k jídlu, křečemi v břiše, průjmami, bolestí hlavy, kovovou chutí v ústech, podrážděním dýchacích cest, letargií a kožními záněty. Při laboratorním vyšetření je zjištěn glykosurie, proteinurie a leukocytóza [13; 25, s. 406; 46, s. 200].

Dlouhodobý nadměrný příjem zinku způsobuje zhoršené vstřebávání až deficit mědi. Zinek totiž v tenkém střevě soupeří s mědí o navázání na transferovou bílkovinu metalothionein, a proto je při jejím obsazování úspěšnější právě zinek, který je přítomen v nadbytku [6, s. 66].

Chrom (Cr)

V přírodě se nejčastěji Cr vyskytuje v trojmocné nebo šestimocné formě. Zatímco šestimocný chrom je genotoxický, trojmocný chrom má v těle fyziologickou funkci. Pro lidský organismus je lépe využitelný chrom získaný z organických zdrojů, nežli ten z anorganických [25, s. 411; 44, s. 335]. Celkový obsah v lidském těle se pohybuje v rozmezí 1,7 – 6 mg [6, s. 72; 7, s. 33].

V krvi se vyskytuje jak ve formě vázané, tak ve formě volné. Vázan je na transportní bílkoviny albumin a transferin a tvoří součást glukózového tolerančního faktoru. Je součástí oligopeptidu chromodulinu, který se váže na receptory stimulované inzulinem a zesiluje tak jeho signalizaci. Chrom tak zlepšuje využití glukózy, snižuje riziko cévních onemocnění, koncentraci cholesterolu a triacylglycerolů.

Z krve je vylučován kostmi a hromadí se v játrech, slezině a ledvinách. Vylučován je hlavně močí [25, s. 411].

Chrom inhibuje superoxiddismutázu [44, s. 335].

Nedostatečný příjem chromu má za následek poruchy metabolismu glukózy, bílkovin a tuků. Deficit chromu byl prokázán u pacientů dlouhodobě závislých na parenterální výživě, u kterých byla zároveň zjištěna hyperglykémie,

kteřá nereagovala na léčbu inzulinem. Dále bylo pozorováno hubnutí, glykosurie, zvýšená hladina krevních tuků, ataxie a periferní neuropatie. Tyto příznaky zmizely při zvýšení příjmu chromu standardní výživou [6, s. 73; 4, s. 88; 25, s. 411].

Protože je chrom obsažen skoro ve všech potravinách, nesetkáváme se u zdravých lidí s jeho nedostatkem. Příjem chromu by však měl být dostatečný u diabetiků a těhotných žen. Chrom obsahují například kvasnice, cereálie, rostlinné oleje, droždí, maso, pšenice, ústřice, brambory, mořské plody nebo játra [7, s. 33-34; 16; 25, s. 411].

Toxické účinky šestimocného chromu byly pozorovány pouze u přímo exponovaných osob při vdechování chromu v průmyslových exhalacích. U takových osob se mohou objevit dermatitidy, kožní (chromové) vředy nebo zvýšený výskyt rakoviny plic. V akutních případech se setkáváme s průjmy, bolestmi břicha, zvracením a není-li včas zjištěna lékařská pomoc, může dojít k těžkému poškození ledvin a jater [4, s. 88; 6, s. 73; 7, s. 34; 25, s. 411].

Toxické koncentrace chromu mají za následek inhibici DNA polymerázy.

Selen (Se)

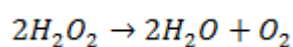
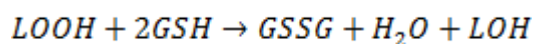
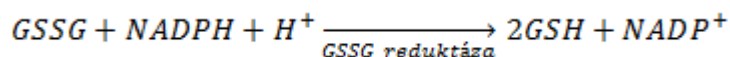
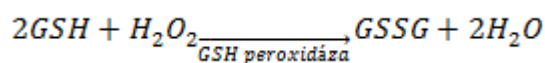
Selen je stopový prvek, který je nezbytný v malých množstvích a stejně jako všechny ostatní prvky, je ve vysokých dávkách toxický [19].

Biologicky dostupnější je selen z organických forem sloučenin. Resorpce, probíhající hlavně v duodenu, je negativně ovlivňována vlákninou, metioninem, zinkem, kadmíem a rtutí. Resorbován je jako selenomethionin a selenocystein. Poruchy resorpce selenu jsou známy například u pacientů s Crohnovou chorobou. Vyskytuje se v mozku, štítné žláze, srdečním a kosterním svalu, ovariích a varlatech. Selen je vylučován převážně močí a stolicí [25, s. 408].

Selen je jako součást selenocysteinu zabudován do selenoproteinu. V krvi je nejvíce obsažen v selenoproteinu P a v antioxidačním enzymu glutathionperoxidáze. Menší část je navázána na albumin. Funkce selenoproteinů je nejen transportní a strukturální, ale především enzymatická. Účinky selenu jsou spojovány s působením selenocysteinu v aktivních centrech enzymů. Ten se tak podílí na řadě významných fyziologických i patologických dějů [25, s. 408].

Selen je důležitý antioxidant. Je součástí enzymu glutathionperoxidázy (GPx). Glutathionperoxidáza chrání buňky před poškozením peroxidy, hlavně peroxidem vodíku, hydroxylovými radikály. Katalyzuje redukci hydroperoxidů lipidů (LOOH)

na alkoholy (LOH). Peroxid vodíku redukuje na vodu a molekulární kyslík [19; 20; 25, s. 408].



Selen je součástí důležitého enzymu jodtyronin-dejodázy. Dejodáza se účastní přeměny tetrajodtyroninu na biologicky aktivní trijodtyronin. Jiný enzym vyžadující selen, thioredoxin reduktáza, hraje roli v regulaci buněčného růstu [21; 19; 45, s. 346; 57].

Selenoproteiny mají řadu funkcí. Prostatický selenoprotein je při nedostatku Se spojován s rakovinou prostaty. Selenoprotein R pak má antioxidační funkci.

Selen je schopen do určité míry chránit před vlivy některých toxických prvků. Účinkuje také v endotelu, kde inhibuje adhezi molekul a chrání ho před peroxinitrem. Proto se o něm mluví také v souvislosti s prevencí vaskulárních a srdečních chorob [25, s. 408; 45, s. 204].

Se se dále účastní spermiogeneze a metabolismu testosteronu, a jeho nedostatek tak může vést k neplodnosti. Důležitý je také pro imunitu, protože nedostatek selenu působí apoptózu T-buněk. Uplatňuje se i při progresi HIV infekce. Deficit selenu v organismu má často za následek zvýšenou mutagenitu a virulenci virů [5 s. 51; 25, s. 408-409].

Recentní studie zmiňují významnou roli selenu v prevenci a léčbě nádorových onemocnění. Tyto studie ukázaly, že doplnění stravy o určité dávky selenu dramaticky snížilo počet případů rakoviny. Byl zaznamenán pokles úmrtnosti na rakovinu a pokles výskytu kolorektálního karcinomu, rakovinu plic a prostaty u dobrovolníků, kteří po určitou dobu užívali selenové doplňky ve srovnání s těmi, kteří užívali placebo. Jiné výzkumy ukázaly, že selen inhibuje růst buněk rakoviny prsu. Na druhé straně

však existují studie, které tyto informace nepotvrdily, či dokonce vyloučily [5 s. 15, 39, 42, 46-48].

Výrazný pokles plazmatických hladin selenu je zdůvodňován jeho zvýšeným příjmem do traumatizovaných tkání. U nemocných s nádory bývají snížené hladiny sérového selenu, zatímco v nádorové tkáni jsou hodnoty selenu zvýšené [25, s. 408; 45, s. 204].

Snížené hladiny selenu v organismu se objevují při proteinurii, kdy je selen ve zvýšené míře vylučován močí. Koncentrace selenu klesají také při renální insuficienci, u dialyzovaných pacientů, dětí na umělé výživě a u pacientů v kritických stavech. Důsledkem nedostatečného příjmu selenu v potravě mohou být různá onemocnění srdce a cév [25, s. 409].

Deficit selenu se může projevit jako Keshanská nemoc. Jedná se o kardiomyopatii postihující děti a těhotné ženy. Může se také rozvinout Kashin-Beckova choroba, která je charakterizována degenerací páteře a kloubní chrupavky. Z dalších příznaků je to například poškození imunity, anemie, fibrózy jater a slinivky břišní, porucha reprodukce u mužů. Keshanská nemoc a Kashin-Beckova choroba byly pozorovány především v Číně. V Evropě se vyskytují deficity, které se projevují méně závažně, například úbytkem svalstva, svalovou slabostí, sníženou výkonností a celkovou zpomaleností [6, s. 69; 25, s. 409].

K lidem ohroženým deficitem selenu patří těhotné ženy, lidé s Downovým syndromem a cystickou fibrózou, pacienti na kardiochirurgických, anesteziologických a resuscitačních odděleních a jednotkách intenzivní péče, a také pacienti s popáleninami [25, s. 409, 45, s. 204].

Toxicita selenu (selenóza) je vzácná. Zvyšuje ji deficit vitamínu E. Mohou se při ní objevit pocity na zvracení, zvracení, ztráta vlasů, problémy s nehty, podrážděnost, únava, zápach z úst po česneku [6, s. 69; 14; 25, s. 409].

Zdrojem selenu jsou masa, mořské plody a ryby, mléčné výrobky, vejce, para ořechy, česnek, fazole a obilné produkty. Vždy však záleží na obsahu selenu v půdě [6, s. 68; 22, s. 11].

Mangan (Mn)

Mangan patří mezi prvky esenciální, je ale také velmi toxický. Vyskytuje se ve dvojmocné, trojmocné a čtyřmocné formě. S nižším stupněm oxidace stoupá

jeho toxicita. Přirozeně se mangan vyskytuje v osmi různých oxidačních stavech [44, s. 341].

Transport manganu v těle je zprostředkován vazbou na krevní bílkoviny, zejména tedy na alfa-2-makroglobulin. Je přenesen do jater, oxidován, navázán na transferin a transportován tak do tělesných tkání. Vylučován je především žlučí [6, s. 73].

Mangan je součástí pigmentů, tmavé kůže a tmavých vlasů [44, s. 342].

Mn^{2+} může být u mnoha enzymatických reakcí nahrazen Mg^{2+} , a naopak. Přesto má mangan několik klíčových rolí, zejména v řadě fyziologických procesů. Je součástí enzymů glykosyltransferáz a kináz, které se podílejí na tvorbě energie z mastných kyselin. Mn se účastní syntézy cholesterolu a lipolýzy v játrech. Podílí se na tvorbě glukózy z laktátu prostřednictvím pyruvátkarboxylázy. Je také aktivátorem řady dalších enzymů. Aktivuje například alkalickou fosfatázu a aminopeptidázu. Tvoří nepostradatelnou část enzymu karboxypeptidázy. Pyruvátdekarboxyláza zase vyžaduje malé množství manganu jako kofaktoru. Snižuje syntézu glukosaminoglykanů prostřednictvím glykosyltransferáz. Mangan je též součástí antioxidačního enzymu superoxiddismutázy (SOD), který pomáhá v boji proti volným radikálům. Zajišťuje odstranění nejběžnějšího volného radikálu, superoxidu. Ten sám o sobě není příliš reaktivní, ale mohou z něj vznikat mnohem škodlivější reaktivní formy kyslíku jako například peroxid vodíku, hydroxylový radikál, peroxyinitrit nebo kyselina chlorná [19; 6, s. 73; 23; 44, s. 341-342].

Řada enzymů závislých na manganu hraje důležitou roli v metabolismu sacharidů, aminokyselin a cholesterolu. Pyruvátkarboxyláza a fosfoenolpyruvátkarboxykináza jsou velmi důležité v glukoneogenezi. Argináza je potřebná v játrech v močovinovém cyklu [19].

Mangan během své absorpce interaguje s vápníkem, fosfáty a železem. Při deficitu železa je jeho absorpce zvýšena asi dvakrát až třikrát [44, s. 342].

Mangan je kofaktorem glykosyltransferáz, potřebných pro syntézu proteoglykanů, které potřebujeme pro tvorbu zdravých chrupavek a kostí, jeho nedostatek tedy vede k abnormálnímu vývoji skeletu [19].

Deficit manganu je spojován s nevolností, zvracením, glukózovou intolerancí, kožní vyrážkou, nadměrným úbytkem kostní hmoty, hypocholesterolemií, závratí a poruchou funkce reprodukčního systému [20].

Toxicita manganu může být způsobena vdechováním par a prachu obsahujících mangan. U exponovaných povolání (horníci) se v důsledku nadměrného vdechování par a prachu mohou objevit halucinace a projevy podobné jako u Parkinsonovy choroby. Tyto příznaky vzniklé intoxikací manganem jsou označovány jako tzv. manganové šílenství [6, s. 74].

Zvýšené hladiny manganu byly nalezeny ve spojení s akutní a chronickou hepatitidou nebo u posthepatální cirhózy, u dialyzovaných pacientů a někdy také u akutních ischemických chorob srdečních. Vysoké hodnoty manganu se vyskytují také u pacientů s biliární obstrukcí [44, s. 341].

Bohaté potravinové zdroje manganu jsou ořechy, pšeničné klíčky, luštěniny, zelenina, ananas a z nápojů například čaje [24; 6, s. 73].

1.1.2 Ultrastopové prvky

Ultrastopové prvky jsou ty, jejichž odhadovaná potřeba je obvykle menší než 1 µg/g. Do této kategorie patří hliník, arsen, bor, brom, kadmium, chrom, fluor, germanium, jod, olovo, lithium, molybden, nikl, rubidium, selen, křemík, cín a vanad [50; 51, s. 397].

Nedostatečný příjem byl pozorován zatím spíše při laboratorních pokusech, takže jejich esenciální role byla prokázána pouze u některých živočišných druhů [6, s. 75].

Vzhledem k tomu, že některé prvky patřící do této skupiny jsou již v této práci zmíněny podrobněji, a také proto, že funkce řady z těchto prvků (např. Sn, V, B, Br, Rb) není zcela objasněna, zmíním zde pouze krátce jejich pravděpodobnou roli v organismu.

Předpokládá se, že bor je metabolickým regulátorem a může mít vliv na funkci buněčné membrány [6, s. 75].

Biochemická funkce vanadu zatím nebyla jasně prokázána. Zjistilo se však, že svými účinky podporuje funkci inzulinu. Jeho nedostatek u člověka není dosud znám [6, s. 76-77].

Nikl je zřejmě také součástí některých enzymů. Důležitý je snad i v metabolismu vitamínu B₁₂ a listové kyseliny [6, s. 75]. Někteří autoři se zmiňují i o jeho vlivu na železo [4, s. 95; 7, s. 53].

Křemík je zmiňován v souvislosti s tvorbou a formováním kostí. Ovlivňuje složení a kalcifikaci chrupavky a tvorbu kolagenu a pojivové tkáně a podílí se na metabolismu fosforu [6, s. 76; 4, s. 90].

Germanium je studováno z hlediska možných protinádorových účinků, jeho anorganické formy jsou však vysoce toxické [6, s. 77].

Lithium se používá v léčbě a prevenci duševních chorob. Někdy je také používáno k léčbě určitých krevních poruch, deprese či schizofrenie. Při laboratorních experimentech na zvířatech byla v důsledku deficitu lithia pozorována snížená porodní hmotnost a zhoršená fertilita [17; 6, s. 78].

Rubidium je prvek, jehož funkce v těle zatím není jasná. Nedostatek rubidia byl pozorován u některých zvířat, avšak u člověka nebyl zatím s jistotou prokázán [18; 6, s. 78].

1.1.3 Toxické prvky

Toxické kovy představují anorganické prvky, které jsou pro člověka i v malém množství jedovaté. Jsou schopny způsobit charakteristické funkční poškození a orgánové změny [44, s. 350].

Často jsou uváděny pod pojmem těžké kovy. Do této skupiny jsou řazeny zejména kadmium, olovo, hliník, rtuť a thalium [44, s. 350].

V přírodě se tyto prvky hromadí ve formě rozpustných solí, např. v rostlinách, vodách a potravě. V těle vytváří komplexy s proteiny a mají tak toxický a inhibiční vliv na enzymy.

U těchto látek není vyloučeno, že jsou v nepatrných množstvích pro organismus nezbytné a to i přesto, že jsou velmi toxické. Stanovují se metodami atomové absorpční spektrofotometrie [7, s. 8; 10; 44, s. 350].

Účinek toxických kovů se projevuje nejčastěji mikroangiopatií. Typické příznaky toxických kovů jsou glomerulární nefropatie, encefalopatie, porucha funkce střev či stomatitidy. Poškození jednotlivých orgánů závisí na jejich rozdílné schopnosti absorbovat a ukládat tyto prvky. Například rtuť a olovo se z nejasných důvodů hromadí přednostně v ledvinách, kostech a játrech [44, s. 350].

1.2 Indikace k vyšetření stopových prvků

Vyšetření stopových prvků v biologických materiálech je indikováno v případech, kdy existuje podezření na jejich možný deficit a to především tehdy, jsou-li přítomny klinické příznaky svědčící pro jejich nedostatek. Tyto příznaky však často nebývají specifické. Pokud organismu není zajištěn dostatečný přísun chybějící složky, může deficit některých prvků vést ke vzniku chorob. Koncentrace stopových prvků v krvi může být také citlivým ukazatelem střevní malabsorpce. Vyšetření se dále indikuje u pacientů na dlouhodobé parenterální výživě, při zavedené léčbě zahrnující některý z elementů a důležité je také sledování koncentrací u lidí, kteří jsou účinkům stopového prvku dlouhodobě vystavováni, např. horníci, skláři [6, s. 74; 44, s. 330].

1.2.1 Preanalytická fáze

Vzhledem k tomu, že koncentrace stopových prvků jsou velmi nízké, je nutné v preanalytické fázi zabránit kontaminaci vzorku. Je doporučeno používat odběrové soupravy a nádoby vyvinuté pro analýzu stopových prvků. Pro sérum se používají plastové nádoby z vhodných materiálů (polypropylen, polyethylen) myté 10 % kyselinou dusičnou minimálně 24 hodin a pak opláchnuté 3x redestilovanou vodou nebo komerčními přípravky na odstraňování stop kovů. Nádoby pro odběr vzorků musí být sterilní a ihned po odběru opatřené zátkou. Mohou se použít i zkumavky se separačním gelem, pokud splňují podmínky pro analýzy stopových prvků. Není však vhodné používat zátky gumové. Po odběru je nutno vzorky ihned dopravit do laboratoře. K analýze je potřeba 100 μ l séra, proto je nutné odebrat alespoň 200 μ l [58; 59].

Stabilita Se i Mn v séru je za laboratorní teploty 1 týden (při cca 20 °C), 2 týdny v chladničce (při 4 – 8 °C) a 1 rok v mrazícím boxu (při -20 °C) [44, s. 332; 58; 59].

1.2.2 Vyšetřovaný materiál

Stopové prvky se stanovují v různých biologických materiálech. Nejčastěji je to sérum, plazma, plná krev nebo moč, ale mohou to být i vlasy, případně nehty. Jejich koncentrace se liší vzhledem k odlišné fyziologické funkci v organismu a s ohledem na druh tkáně, ve které se nacházejí. Koncentrace stopových prvků mohou fyziologicky kolísat v průběhu dne. Jejich výrazné krátkodobé výkyvy lze zaznamenat

při poraněních nebo chirurgických zákrocích. Naopak, nedostatečný příjem potravy je dlouhodobě v krvi nerozpoznatelný. Je tedy nutné si uvědomit, že sérové ani plazmatické hladiny stopových prvků nemusí nutně odrážet jejich koncentrace v orgánech, a tudíž nemusí jasně vypovídat o situaci v organismu. Při výběru analytické metody by měly být všechny tyto aspekty uváženy [44, s. 331].

Vyšetření stopových prvků v likvoru se v běžné klinické praxi neprovádí. Je však několik studií, které se zabývají stanovením koncentrací stopových prvků a hledáním souvislostí mezi jejich hladinami v tělních tekutinách a přítomným onemocněním [52; 53; 60; 61; 62].

2 METODY STANOVENÍ STOPOVÝCH PRVKŮ

Ke stanovení stopových prvků je v současné době využíváno několik metod. Některé z nich se v laboratořích používají rutinně, jiné nacházejí své uplatnění spíše na výzkumných pracovištích. K běžně používaným metodám v laboratořích patří fotometrie, atomová absorpční spektrofotometrie (AAS), plamenová emisní spektrofotometrie (FES), voltametrie a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

Výzkumně se využívají např. neutronová aktivační analýza (NAA), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), hmotnostní spektrometrie s izotopovou dilucí (ID-MS), atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES), rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), elektrochemické metody, spektrometrie laserem indukovaného plazmatu (LIBS), fluorimetrie, reflexní rentgenová fluorescence (TR-RF), diferenční pulzní anodická voltametrie (DPASV), částicemi vyvolaná rentgenová emise (PIXE) [25, s. 404; 31; 32; 33; 44, s. 330-331].

Ve své práci využiji ke stanovení stopových prvků atomovou absorpční spektrometrii, proto se budu této metodě podrobněji věnovat v následující samostatné kapitole. Věnovat se budu také modifikacím metody AAS a podrobněji popíši základní části a princip absorpčního fotometru.

2.1 Atomová absorpční fotometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod. Podstatou metody je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Při srážce fotonu s volným atomem dochází k absorpci elektromagnetického záření, tedy k pohlcení energie (energetických kvant fotonů) těmito atomy prvku a převedení elektronů v atomech ze základních atomových orbitalů na orbitály s vyšší energií, tzv. excitace atomu. Jelikož jsou rozdíly energií jednotlivých elektronových stavů charakteristické pro každý prvek, lze volbou vlnové délky jednotlivé prvky selektivně stanovovat [36, s. 87; 35, s. 67; 37].

Pokud má molekula přejít ze stavu s nižší energií E_q do stavu s energií vyšší E_p , musí absorbovat záření takové frekvence ν , která odpovídá rozdílu energií mezi hladinami obou kvantových stavů podle Planckova zákona [38, s. 128]:

$$\Delta E = E_p - E_q = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \sigma$$

kde

E_p = energie excitovaného stavu [J]

E_q = energie základního stavu [J]

h = Planckova konstanta ($h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ J·s)

ν = frekvence [$s^{-1} = \text{Hz}$]

c = rychlost záření [$m \cdot s^{-1}$]

λ = vlnová délka [m]

σ = vlnočet [m^{-1}]

Při přechodu ze základního do excitovaného stavu dochází k úbytku primárního záření. Úbytek primárního záření je zároveň mírou koncentrace volných atomů prvku, který záření absorboval [10; 37]. Absorbance je dle Lambertova -Beerova zákona přímo úměrná látkové koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy dle vztahu:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = a \cdot c \cdot l$$

kde A je absorbance, Φ_0 je světlo vstupující do měřeného prostředí, Φ světlo vystupující z měřeného prostředí, l tloušťka absorbující vrstvy (délka optické dráhy), a = molární absorpční koeficient pro danou vlnovou délku a c je látková koncentrace roztoku [25, s. 1023].

2.2 Instrumentace v AAS

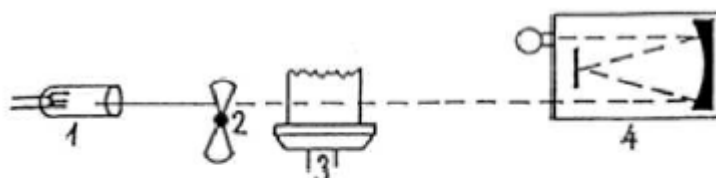
K měření intenzity záření v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti spektra se používají spektrometry [25, s. 1023].

Atomové absorpční spektrometry jsou konstruovány jako jednopaprskové nebo dvoupaprskové přístroje. Jednopaprskové přístroje sekvenčně měří nejprve neabsorbovanou čáru, a pak absorbovanou. Dvoupaprskové přístroje porovnávají dva paprsky získané dělením zdrojového záření rotujícími zrcadlovými segmenty. Jeden

paprsek prochází přes absorbující prostředí, druhý mimo. Schéma jednopaprskového a dvouprskového spektrofotometru je na obrázcích 2 a 3.

Obrázek 2. Schéma jednopaprskového fotometru

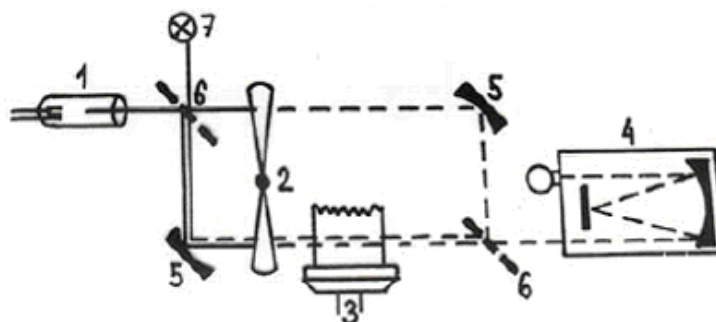
Převzato z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/03-asx-aas-1321623157.pdf> [40].



- 1 - čárový zdroj
- 2 - rotační modulátor
- 3 - atomizátor
- 4 - monochromátor

Obrázek 3. Schéma dvouprskového fotometru

Převzato z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/03-asx-aas-1321623157.pdf> [40].



- 1 – výbojka s dutou katodou
- 2 – modulátor paprsku
- 3 – absorpční zóna (plamen nebo elektrotermický atomizátor)
- 4 – monochromátor a detektor
- 5 – dutá zrcadla
- 6 – polopropustná zrcadla
- 7 – deuteriová lampa

Podstatnými součástmi atomového absorpčního spektrofotometru je zdroj monochromatického záření, absorpční prostředí (atomizátor), mřížkový nebo hranolový monochromátor, fotonásobič jako detektor se zesilovačem, zařízení pro záznam absorpčního signálu.

Zdrojem světla pro viditelnou část spektra bývá nejčastěji wolframová žárovka, pro ultrafialovou část spektra se používají především deuteriové výbojky a pro obě oblasti potom rtuťové a xenonové výbojky. Uplatnění v optických metodách jako zdroje záření nacházejí i LED lampy a laser [25, s. 1023; 1, s. 104]. Protože zdroj světla vyzařuje široké spektrum záření, je nutné z něj izolovat pouze co nejužší pás vlnové délky charakteristický pro stanovovaný prvek. K tomuto účelu slouží interferenční filtry nebo reflexní mřížky. Mřížky jsou součástí monochromátoru, který obsahuje ještě vstupní a výstupní štěrbinu. Díky nim vychází z monochromátoru úzký pás vlnových délek záření blízký nominální vlnové délce [25, s. 1024; 28].

Atomizátor slouží k převedení vzorku do stavu volných atomů. Jeho teplota by měla být dostatečná k atomizaci, ale nižší, než je třeba k excitaci atomů. Potřebná teplota je obvykle 2000 až 3000 °C.

Detektory slouží k měření zářivé energie propuštěné vzorkem a následnému převodu této energie na energii elektrickou. Jako detektor se používá fotonásobič. Principem fotonásobiče je ozáření dynod ve fotokatodě s následným uvolněním sekundárních elektronů. Elektrony emitované z první dynody jsou urychlovány a dopadají na druhou dynodu, kde se proces sekundární emise opakuje. Z poslední dynody dopadají elektrony na anodu a jejich počet je několikanásobně vyšší než počet fotoelektronů [25, s. 1023-1024; 29].

U fotonek se elektrony uvolňují z fotokatody a po dopadu fotonů se účinkem sacího napětí pohybují směrem k anodě [25, s. 1024].

U detektorů s diodovým polem je světlo rozptýleno mřížkou na pole mnoha fotosenzitivních diod. Vzniká tak napětí, které je převedeno na digitální signál [25, s. 1024].

2.3 Pracovní techniky AAS

Mezi nejběžněji používané laboratorní techniky AAS patří plamenová AAS, vhodná pro stanovení vyšších koncentrací (řádově desetiny až desítky μg) a elektrotermická AAS pro stanovení stopových množství (řádově setiny až desítky ng). Mezi speciální metody je možno zařadit hydridovou techniku AAS.

2.3.1 Plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (FAAS)

Stanovované prvky jsou atomizovány při teplotě 2000 – 3000 °C. Vzorek je po injekci transportován na nebulizer, neboli zmlžovač, ve kterém je vzorek přeměněn v aerosol. V této formě je rozprašován pomocí trysky do mlžné komory a proudí spolu s palivovou směsí acetylen-vzduch přes hořák do plamene, kterým prochází paprsek světla o vhodné vlnové délce. Zdrojem tohoto záření je nejčastěji výbojka (lampa) s dutou katodou. Katoda je vyrobena z kovu, pro který je daná lampa určena. Jako zdroj záření se používají i bezelektrodové výbojky, superlampy nebo laserové diody [1, s. 105; 3, s. 179]. Mřížkový monochromátor vyčlení úzký obor vlnových délek z širšího spektra elektromagnetického vlnění. Prošlé záření je zaznamenáváno detektorem, kterým je fotonásobič [3, s. 179].

Výhody plamenové AAS jsou především rychlá analýza, velmi dobrá opakovatelnost, snadná korekce rušivých vlivů a menší vliv interference matrice, na rozdíl od ETA-AAS, snadná automatizace měření, přijatelná cena přístrojů, stejně jako nenákladný provoz.

Nevýhodou této metody je, že se pouze malá část analyzovaného vzorku skutečně využije pro analýzu, takže se tato metoda používá jen při stanovování většího množství analytu ve vzorku. Dalším problémem je také ionizace některých analytů v plameni, zejména alkalických kovů a kovů alkalických zemin [35, s. 75; 42; 43].

2.3.2 Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS)

ETA-AAS je jednou z nejpoužívanějších technik pro stopovou analýzu klinických materiálů a to díky malé potřebě vzorku, vysoké citlivosti a specifičnosti a dobré cenové dostupnosti [25, s. 404; 31; 32; 33; 44, s. 330-331].

Pro tvorbu volných atomů slouží v případě této metody tzv. atomizátor. V něm se neexcituje iontová forma prvku, ale dochází k rozrušení chemických vazeb v molekulách přítomných sloučenin [36, s. 87]. Atomizátor je schopen převést prvky z roztoku vzorku do plynného atomárního stavu. Atomizátorem je malá grafitová kyveta s dávkovacím otvorem, do kterého je dávkovačem při analýze aplikováno 10-40 µl vzorku. Aby mohlo dojít k přechodu prvku do plynného atomárního stavu, je zapotřebí velmi vysokých teplot. Proto je tato kyveta vyhřívána elektrickým proudem na teplotu

2000 – 3000 °C. Kyveta je zahřívána v přítomnosti velmi čistého argonu, čímž se zabraňuje tomu, aby se k atomům stanovované látky dostal kyslík ze vzduchu.

Teplotní program uvnitř atomizátoru je tvořen několika teplotně odlišnými kroky a musí být pro daný přístroj a daný prvek optimalizován. Prvním krokem je odpaření vzorku z odporově vyhřívané podložky, následuje pyrolýza, kterou se odstraní těkavé látky a provede se atomizace. Čtvrtým krokem je čištění a v posledním kroku se kyveta ochladí a může následovat další cyklus [25, s. 1025; 34; 35, s. 75-77].

Kyvety se nejčastěji vyrábí z grafitu, pyrolytického grafitu, wolframu, tantalu, molybdenu nebo skelného uhlíku, materiálů, které jsou elektricky vodivé a při vysokých teplotách stálé. Vzorek může být aplikován na stěnu kyvety, na platformu nebo na sondu [35, s. 75].

Jako zdroj záření emitujícího elektromagnetické záření se pro netěkavé kovy používá dutá katodová výbojka. Katoda je vyrobena z vysoce čistého kovu, pro který je daná výbojka určena. Výbojky s dutou katodou jsou plněny vzácným plynem, argonem či neonem. K jejich výhodám patří provozní stálost. Jejich životnost je několik set provozních hodin. Pro některé těkavé kovy je lepší použít bezelektrodovou vysokofrekvenční výbojku, která potřebuje samostatný napájecí zdroj. Na jeho kvalitě závisí stabilita emitovaného záření [25, s. 1025; 35, s. 71-72].

Oddělení záření o určité vlnové délce umožňují hranoly, difrakční mřížka či interferenční filtry. Hranol rozděluje světlo refrakcí a ohybem a vzniká tak monochromatické záření o kratších vlnových délkách. Difrakční mřížka dělí světlo refrakcí na skleněné nebo plastové ploše vybavené soustavou vrypů. Interferenční filtry ze spektra vyfiltrují světlo o určité vlnové délce a vytváří téměř jednobarevné světlo.

ETA-AAS k tomuto účelu využívá monochromátor. Jeho součástí je mřížka, ale může to být i hranol, dále vstupní a výstupní štěrbina a zrcadla jako pomocná optika. Tento disperzní systém izoluje analyzovanou spektrální čáru požadované vlnové délky od ostatních čar spektra. Prošlé záření je zaznamenáváno detektorem [1, s. 104; 35, s. 79].

Úkolem detektoru, který zaznamenal prošlé elektromagnetické záření z monochromátoru je převést toto záření na elektrický signál. Detektorem je nejčastěji fotonásobič, jehož výhodou je velmi vysoká citlivost. Některé moderní přístroje používají křemíkové fotodiody s rozsahem citlivosti 185-1100 nm nebo CCD detektory [39, s. 12, 14].

Předností ETA-AAS oproti FAAS je účast kompletního nadávkovaného množství vzorku na absorpci primárního záření, až o 2 řády vyšší citlivost, a až o tři řády snížený detekční limit, oproti FAAS.

Problémem metody je nutnost kompenzace pozadí vlivem četných rušivých vlivů, pomalá analýza a poměrně vysoké pořizovací náklady [35, s. 77; 42; 43].

2.3.3 *Hybridová technika (HG-AAS)*

Tato metoda využívá převedení prvku chemickou reakcí na těkavý hydrid, který se tak oddělí od matrice vzorku je následně proudem inertního plynu dopraven do speciálního křemenného atomizátoru ve tvaru T. Atomizátory jsou vyhřívány plamenem nebo elektricky.

Ke tvorbě hydridů se používá tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4) v roztoku NaOH a v přítomnosti kyseliny, nejčastěji HCl.

Existuje několik typů hydridových generátorů, dávkové, kontinuální a průtokové injekční. U posledního zmiňovaného typu se analyt dávkuje přímo do kyseliny.

Při kontinuálním provedení je hydrid v separátoru oddělen od kapalně fáze a nosným plynem veden do atomizátoru. Nosný plyn zde představuje argon nebo dusík.

Metoda se využívá pro stanovení stopových koncentrací hydridotvorných prvků jako jsou As, Se, Pb, Te, Sb, Sn, Ge, Bi a další [2, s. 161; 35, s. 78; 42].

Jinou technikou generování těkavých sloučenin je technika studených par. Spočívá v redukci rtuti chloridem cínatým (SnCl_2) nebo tetrahydroboritanem sodným (NaBH_4) na páry rtuti elementární, které jsou nosným plynem unášeny přes sušící vrstvu do kyvety.

K výhodám technik generování par patří nízké limity detekce srovnatelné s ETA-AAS, rychlost měření a omezení rušivých vlivů oddělením matrice od vzorku.

K nevýhodám patří nutnost vhodné chemické formy stanovované látky. Problémy způsobují i vysoké koncentrace některých kovů a vzájemný rušivý účinek při výrazném nadbytku jednoho hydridotvorného prvku nad druhým [35, s. 79; 42].

2.4 **Zdroje chyb v AAS**

Mezi nejběžnější zdroje chyb v AAS patří nespecifická absorpce, interference a matricové efekty.

2.4.1 *Nespecifická absorpce*

Záření procházející absorpčním prostředím může být zeslabeno absorpcí volnými atomy analytu nebo absorpcí pozadí (nespecifickou absorpcí). Ta se při měření přičte k signálu stanovované látky a výsledkem je chyba ve smyslu falešně zvýšené hodnoty. Tato chyba je velkým problémem především metody ETA, kdy se pracuje se vzorkem obsahujícím velmi malé množství analytu. K získání správného výsledku je potřeba odečíst signál pozadí od celkové absorbance. K absorpci pozadí dochází tehdy, když na nevypařených částicích dojde k rozptylu světla. Rozptyl světla se projevuje hlavně u krátkých vlnových délek. Falešně zvýšená chyba měření vzniká také v přítomnosti nedisociovaných molekul anorganických solí obsažených ve vzorku a na rozdíl od rozptylu světla se projevuje ve všech používaných vlnových délkách [35, s. 80].

Nespecifickou absorpci lze eliminovat prostřednictvím korekce pozadí.

Nejčastěji využívanými způsoby korekce pozadí jsou korekce se zdrojem kontinuálního záření, Zemanova korekce, Stokesova korekce a korekce pozadí dle metody Smith Hjetfje.

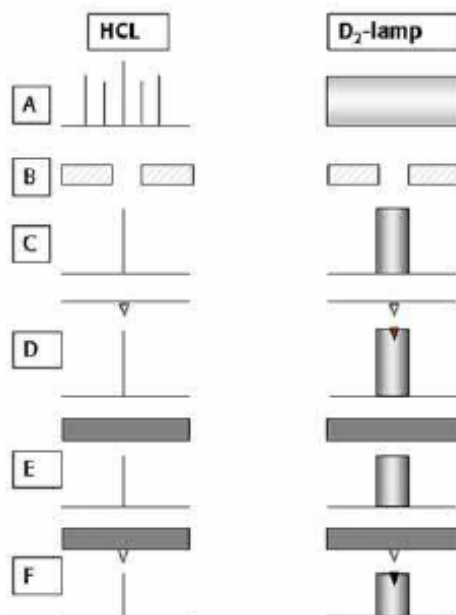
Korekce pozadí se zdrojem kontinuálního záření (systém s D₂ výbojkou)

Výbojka s dutou katodou a výbojka deuteriová střídavě ozařují absorpční prostředí. Střídavě jsou tedy měřeny dva signály, které se od sebe odečítají. Detektor zaznamenává signál odpovídající absorpci samotného analytu.

Korekce D₂ výbojkou je možná jen pro vlnové délky menší než 350 nm a správné výsledky poskytuje pouze v případě, že se na pozadí nevyskytují ostré pásy způsobené rotačními či vibračními přechody [35, s. 80-81].

Obrázek 4. Schéma korekce D₂ výbojkou

Převzato z: <http://www.scribd.com/doc/24668309/42/Deuterium-background-correction> [27].



HCL = hollow cathode lamp = dutá katodová výbojka

D₂-lamp = deuteriová výbojka

Korekce pozadí s využitím Zeemanova jevu

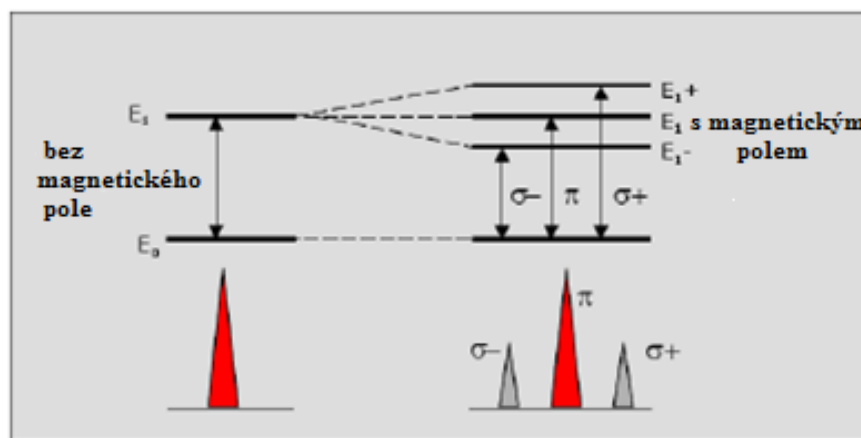
Zeemanovým jevem je nazýváno rozštěpení spektrálních čar vyzařovaných atomy v magnetickém poli. Rozštěpení nastává se změnou energie jednotlivých hladin atomu, které jsou způsobeny právě magnetickým polem. Při štěpení energetických hladin atomu vznikají komponenty označované jako π a σ .

Přístroj obsahuje polarizátor a svůj zdroj záření nebo atomizátor má umístěn v poli elektromagnetu. Absorbance je střídavě odečítána při vypnutém a zapnutém magnetickém poli. Při vypnutém magnetickém poli se měří celková absorbance, která odpovídá absorpci analytu a pozadí. Při zapnutém magnetickém poli se měří pouze absorpce pozadí pomocí σ komponent, které projdou polarizátorem. Detektor poté opět zaznamenává rozdíl těchto dvou signálů, jakožto absorpci čistého analytu.

Tento způsob korekce je nejlepší pro strukturální pozadí a korekci v celém spektrálním intervalu. Jejich citlivost je však nižší a cenová dostupnost vyšší [35, s. 81].

Obrázek 5. Schéma Zeemanovy korekce pozadí

Převzato z: <http://www.scribd.com/doc/24668309/42/Deuterium-background-correction> [27].

*Korekce pozadí metodou Smith-Hieftje*

Dutá katodová výbojka je napájena v cyklu sestávajícího z normálního, vysokého a relaxačního pulsu napájecího proudu. Z rozdílů absorpce při normálním a vysokém napájecím proudu zjistíme absorpenci vzorku.

Výhody a nevýhody jsou stejné jako u kompenzace „systému Zeeman“ [35, s. 81].

Stokesova korekce (Stokesův posun)

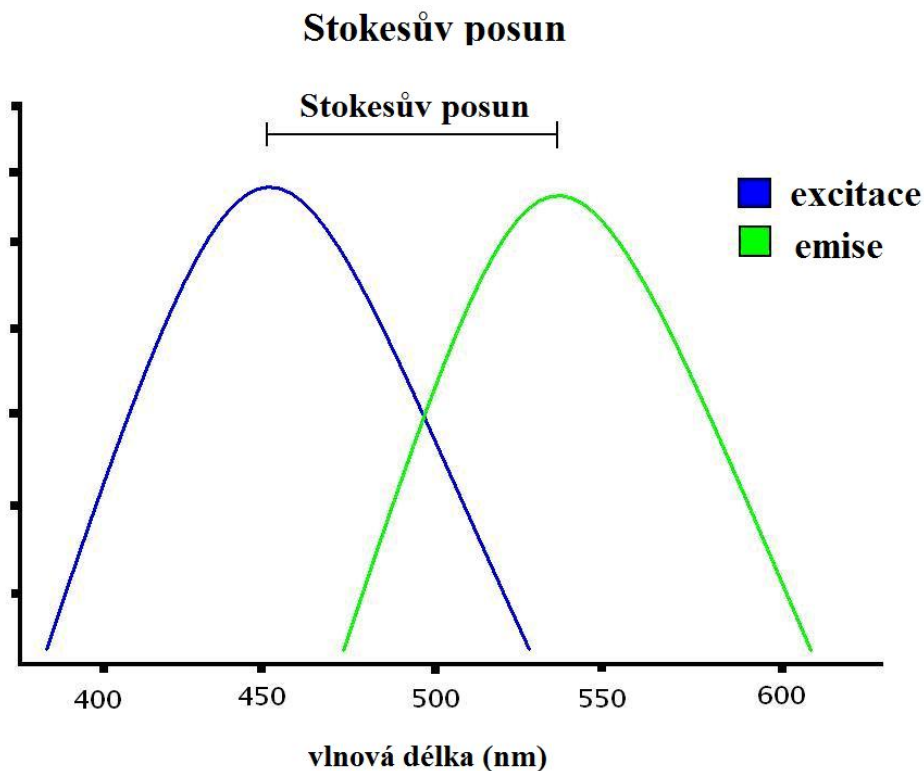
Pokud atomy přijmou elektromagnetické záření, přechází do excitovaného stavu. V případě, že se elektron po excitaci vrátí do vyšší energetické hladiny, než ze které byl vybuzen, dojde k vyzáření fotonu s delší vlnovou délkou než má budící záření. Protože vyzářená energie může být nejvýše rovna té přijaté, vlnová délka emitovaného záření je větší než excitačního [54, s. 15].

$$\lambda_{emise} \geq \lambda_{excitace}$$

Rozdíl v energiích maxima absorpčního a emisního pásu se nazývá Stokesův posun.

Obrázek 6. Stokesův posun

Převzato z <<http://www.advancedaquarist.com>> [55].

**2.4.2 Interference**

Pojmem interference se rozumí jakékoliv rušivé vlivy, které svou přítomností při analýze ovlivní výsledek a správnost měření. Jejich nežádoucí přítomnost má za následek rozdílnou velikost signálu naměřeného pro stejnou koncentraci analytu ve vzorku a v čistém standardu [35, s. 83]. „Interferencí v AAS obecně rozumíme vliv, který způsobí systematické odchylky signálu při analýze“ [35, s. 83].

Interference rozdělujeme podle místa, kde se vyskytují, na interference v kondenzované a plynné fázi [40]. Dále lze interference rozdělit podle mechanismu, kterým vznikají, na chemické a fyzikální [41, s. 21]. Posledním typem interferencí jsou interference spektrální a nespektrální [35, s. 83].

Ke spektrálním interferencím dochází v případě, že měřené spektrální čáry nejsou dostatečně izolovány od záření absorbovaného ostatními částmi vzorku nebo absorpcí pozadí. Tomu lze zabránit výběrem jiných čar a korekcí pozadí.

Nespektrální interference souvisejí s vlastnostmi roztoku vzorku a přítomností rušících prvků matrice [35, s. 83].

Interference v plamenové verzi AAS

V plameni se setkáváme s interferencemi transportu, vzniklými změnami rychlosti sání vzorku nebo účinností zmlžování, vlivem viskozity a povrchového napětí roztoků. Dále to mohou být interference vypařování, kdy je signál ovlivněn přítomností těkavých látek co do stupně jejich těkavosti. Aby byly tyto vlivy odstraněny, je nutné použít roztoky se stejnou těkavostí. Větší uplatnění má použití uvolňovacího činidla, které nežádoucí interferenci přemění na těžko těkavou sloučeninu.

Prostorové rozložení atomů v plameni a ovlivnění disociace či ionizace představují interference plynné fáze. Ty jsou eliminovány přidávkem ionizačního pufru [35, s. 83; 40].

Interference v bezplamenové verzi AAS

V kondenzované fázi jsou pozorovány jako změny v rozložení stanovované látky na atomizační podložce, stejně tak jako změny nasákavosti této podložky. Dále mohou interference představovat vznik snadno těkavých sloučenin a tudíž úbytek analytu nebo vznik termostabilní sloučeniny, která se těžko atomizuje [40].

V plynné fázi ovlivňují disociační rovnováhy a kinetiku procesu [35, s. 83; 40].

Tyto interference lze eliminovat použitím matricových modifikátorů a zvýšením izotermičnosti atomizace, eventuálně použitím jiného povrchu pro atomizaci [40].

Matricové modifikátory jsou sloučeniny, které eliminují působení interferencí tím, že ovlivňují jejich těkavost. Jsou přidávány ke vzorku buď před nástřikem, nebo po nástřiku do kyvety. Modifikátory převádějí matrice na těkavější složky, které jsou eliminovány z atomizátoru ještě před atomizací a vytváří s analyty termostabilní komplexy, což umožní zvýšit teplotu atomizace [40].

3 CÍLE PRÁCE

- 1. Ověřit možnost stanovení selenu a manganu v likvoru metodou atomové absorpční spektrometrie prostřednictvím stanovení meze detekce.**

- 2. Stanovit koncentrace selenu a manganu v likvoru na vybraných souborech pacientů**
 - a) u pacientů s neurologickými onemocněními**
 - b) u pacientů s onkologickými onemocněními**

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ, MATERIÁL A METODY

4.1 Charakteristika souboru pacientů

Bylo vyšetřeno 73 pacientů (průměrný věk 14,1 let, věkové rozmezí od 4 měsíců do 77 let), z toho bylo 31 žen (průměrný věk 17 let, věkové rozmezí 5,5 měsíce až 77 let) a 42 mužů (průměrný věk 12 let, věkové rozmezí 4 měsíce až 76 let). Pacienti byli rozděleni do dvou skupin dle věku na děti (56 jedinců) a dospělé (17 jedinců).

Dále byli pacienti rozděleni do tří podskupin podle diagnóz. První skupina byla tvořena 26 pacienty s neurologickými diagnózami (např. epilepsie, lymeská nemoc, encefalitidy, myelitidy a encefalomyelitidy). Druhá skupina byla tvořena 29 pacienty s onkologickými diagnózami (leukemie, lymfomy, zhoubné nádory mozku). Třetí srovnávací skupina byla tvořena 18 pacienty, s jinými než onkologickými a neurologickými diagnózami (např. traumatická poranění, ileus, pneumonie).

Před zpracováním vzorku byl u každého pacienta subjektivně zhodnocen vzhled likvoru. Hodnocena byla přítomnost hemolýzy a bilirubinu.

K analýze bylo odebráno vždy 100 μ l vzorku likvoru a následně bylo smícháno se 400 μ l ředícího roztoku.

Pro stanovení Mn a Se v likvoru byly použity stejné reagenty a roztoky, které se používají pro rutinní stanovení Mn a Se v séru.

4.2 Stanovení selenu

Tabulka 2. Kontrolní materiál pro selen

ClinChek – Serum Control, for trace elements Level 1 Střední hodnota 63,3 μ g/l, rozmezí (\pm 2SD) (50,6 – 76 μ g/l)	100 μ l
ClinChek – Serum Control, for trace elements Level 2 Střední hodnota 103 μ g/l, rozmezí (\pm 2SD) (82,4 – 124 μ g/l)	100 μ l

Pracovní standard (30 µg/l Se) příprava:

Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 100 µl zásobního standardního roztoku selenu o koncentraci 1000 µg/ml ve 2 % HNO₃ (Sigma Aldrich, kat. č. 24,792-8), přidá se 1 ml 37 % HCl (Fluka, for trace analysis) a doplní se čerstvou deionizovanou vodou po rysku. Z tohoto roztoku se odeberou 3 ml, přidá se 1 ml HCl a doplní se do 100 ml deionizovanou vodou (v odměrné baňce).

Stabilita roztoku v chladničce při 5 - 8 °C je jeden rok.

Paladiový modifikátor (pro eliminaci interferencí)

0,5 ml 37 % HCl (Fluka, for trace analysis)

250 µl Triton X-100 (~ 10 % v H₂O, Fluka, Ultra, kat. č. 93443)

500 µl dusičnanu paladnatého (paladiový matricový modifikátor, 10 % roztok, Sigma Aldrich, kat. č. 76040)

15 µl Antifoam A (Fluka, kat. č. 10794) – emulze silikonového polymeru zabraňující pění. Vše bylo smícháno a v 5 ml odměrné baňce doplněno deionizovanou vodou po rysku. Připraven byl vždy čerstvý paladiový modifikátor.

Ředící roztok

12,5 ml Triton X-100 (~ 10% roztok v H₂O, Fluka, Ultra, kat. č. 93443)

1 ml Antifoam A (Fluka, kat. č. 10794)

15,6 g kyseliny askorbové (99,5 %, Fluka, Ultra, kat. č. 95209)

250 µl 37 % HCl (Fluka, for trace analysis)

Vše bylo smícháno a ve 250 ml odměrné baňce doplněno deionizovanou vodou po rysku.

Stabilita 3 týdny při 5 - 8 °C.

Proplachovací roztok

2500 µl Triton X-100 (~ 10 % roztok v H₂O, Fluka, Ultra, kat. č. 93443)

2080 µl Antifoam A (Fluka, kat. č. 10794)

250 µl 37 % HCl (Fluka, for trace analysis)

Vše bylo smícháno a v 500 ml odměrné baňce doplněno deionizovanou vodou po rysku.

Byl připraven proplachovací roztok o objemu 1 litr.

Stabilita je 6 měsíců při teplotě 15 - 30 °C.

4.3 Stanovení manganu

Tabulka 3. Kontrolní materiál pro mangan

ClinChek – Serum Control, for trace elements Level 1 Střední hodnota 28,4 µg/l, rozmezí (\pm 2SD) (22,7 – 34,1 µg/l)	100 µl
ClinChek – Serum Control, for trace elements Level 2 Střední hodnota 32,7 µg/l, rozmezí (\pm 2SD) (26,2 – 39,2 µg/l)	100 µl

Pracovní mezistandard A (2 mg/l Mn) příprava:

Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 200 µl zásobního standardního roztoku manganu o koncentraci 1000 µg/ml ve 2 % HNO₃ (certifikovaný referenční materiál 998 mg/l \pm 4 mg/l, Fluka, kat. č. 63534), přidají se 2 ml 37 % HNO₃ (certifikovaný referenční materiál, Fluka, for trace analysis) a doplní se ředícím roztokem po rysku. Stabilita roztoku v chladničce při 5 – 8 °C je jeden rok.

Pracovní standard (2 µg/l Mn)

Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 100 µl mezistandardu A, přidají se 2 ml koncentrované HNO₃ (Fluka) a doplní se ředícím roztokem po rysku. Stabilita standardu v chladničce při 5 – 8 °C je cca 3 týdny.

Ředící roztok

2 ml Triton X-100 (~ 10 % roztok v H₂O, Fluka, Ultra, kat. č. 93443)

2 ml Antifoam A (Fluka, kat. č. 10794)

Vše bylo smícháno a v 1000 ml odměrné baňce doplněno deionizovanou vodou po rysku.

Proplachovací roztok

Byl použit stejný roztok jako pro selen.

4.4 Přístroje a pomůcky

Automatický analyzátor SpectrAA 220Z Varian

Elektrotermický atomizátor GTA 110

Podavač vzorků PSD 100

Řídící modul pro ultralampy UltrAA Varian

Chladicí jednotka Van der Heijden Kühlmobil

Lampa pro selen ($\lambda = 196,0$ nm)

Lampa Photron pro mangan ($\lambda = 279,5$ nm)

Automatické pipety

Špičky

Odměrné baňky

Stojan

Kádinky

Třepačka

Zkumavky umělohmotné, skleněné

Zkumavky Eppendorf

Plastové reagenční nádobky

Stojan na zkumavky

Váhy

Miska

Lžička

4.5 Charakteristika metody ETA-AAS na měření Se a Mn

Pro tuto práci byl použit atomový absorpční spektrofotometr SpectrAA 220Z Varian s grafitovou píčkou pro elektrotermickou atomizaci vzorku, pracující v inertní argonové atmosféře za vysoké teploty generované elektromagnetickým polem. Spektrofotometr využívá Zeemanovy korekce pozadí. K měření selenu byla použita dutá katodová lampa s vlnovou délkou 196 nm, mangan byl měřen při vlnové délce 279,5 nm. Každý vzorek byl přístrojem změřen třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

4.6 Statistická analýza

Ke statistickému hodnocení dat byl využit software GraphPad verze 6.0 (San Diego, Kalifornie). Normalita rozložení dat byla testována pomocí D'Agostinova-Wilsonova testu. K posouzení rozdílů mezi skupinami byl využit Mannův-Whitneyův U-test. Hladina $p < 0,05$ byla zvolena jako statisticky významná.

5 VÝSLEDKY

5.1 Ověření možnosti stanovení selenu a manganu

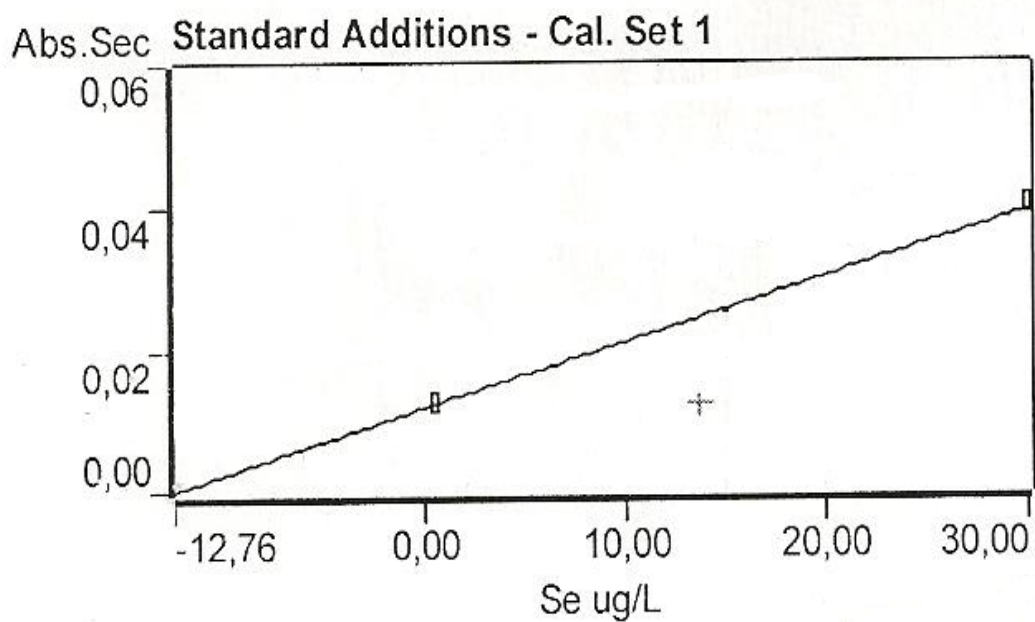
Stanovení meze detekce Se

Mez detekce (LOD) selenu byla získána změřením 10 vzorků ředícího roztoku o nulové koncentraci selenu metodou standardního přídatku. Bylo získáno 10 hodnot rozdílů absorbancí před přídatkem a po přidání standardního přídatku. Pro každý rozdíl absorbancí byl vypočten průměr a trojnásobek směrodatné odchylky. Ke každé hodnotě rozdílu absorbance byla stanovena odpovídající koncentrace blanku a koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky byla určena jako mez detekce.

Tabulka 4. Určení meze detekce selenu

Blank	Absorbance*
1	0,0002
2	0,0001
3	0,0005
4	0,0002
5	0,0001
6	0,0003
7	0,0002
8	0,0004
9	0,0002
10	0,0006
Průměr	0,00028
Směrodatná odchylka	0,000169
3krát SD absorbancí	0,000507
Mez detekce	2,9 µg/l

* V tabulce jsou znázorněny rozdíly absorbancí před přídatkem a po přidání standardního přídatku.

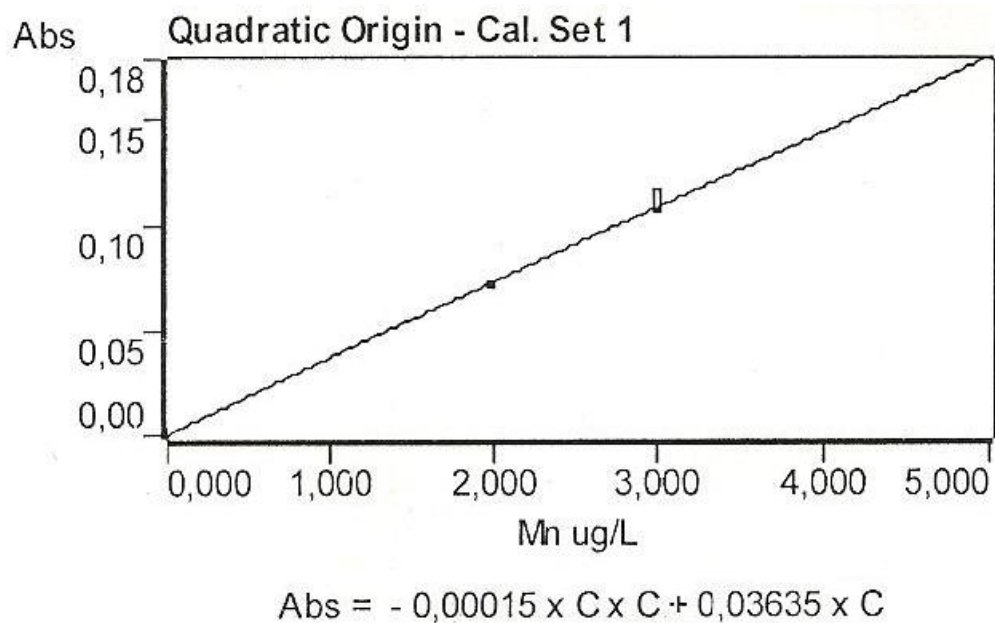
Obrázek 7. Selen: graf kalibrační přímky

Stanovení meze detekce Mn

Mez detekce manganu byla získána změřením absorbancí 10 vzorků ředícího roztoku o nulové koncentraci manganu. Z uvedených výsledků byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka (viz tabulka 5).

Tabulka 5. Určení meze detekce manganu

blank	absorbance
1	0,0073
2	0,0065
3	0,0076
4	0,0094
5	0,0175
6	0,0081
7	0,011
8	0,0089
9	0,01
10	0,0077
Průměr	0,0094
Směrodatná odchylka	0,003152
3krát směrodatná odchylka	0,009456

Obrázek 8. Mangan: graf kalibrační přímky

Hodnota koncentrace 0,26 $\mu\text{g/l}$ pro mez detekce manganu byla po dosažení absorbance odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky blanku do kvadratické rovnice vypočtena dle následujícího výpočtu:

$$-0,00015c^2 + 0,03635c - 0,009456 = 0$$

$$D = b^2 - 4ac$$

$$D = 0,03635^2 - 4 \cdot (-0,00015 \cdot (-0,009456))$$

$$D = 0,0013156$$

$$X_{1,2} = \frac{-b \pm \sqrt{D}}{2a}$$

$$X_1 = \frac{-0,03635 + \sqrt{0,0013156}}{2 \cdot (-0,00015)}$$

$$X_1 = 0,26 \mu\text{g/l}$$

$$X_2 = \frac{-0,03635 - \sqrt{0,0013156}}{2 \cdot (-0,00015)}$$

$$X_2 = 242,07 \mu\text{g/l}$$

Koncentraci $X_2 = 242,07 \mu\text{g/l}$ nelze použít jako detekční limit pro stanovení Mn, neboť je významně vyšší, než jsou publikovaná referenční rozmezí pro Mn v biologických materiálech (Mn v séru 0,43 – 0,76 $\mu\text{g/l}$) [58].

Paralelně se slepými vzorky byl stanovován v každé sérii měření kontrolní materiál ClinChek (viz kapitola 4.2 a 4.3).

Pro mangan byly naměřeny hodnoty kontrol 30,96 $\mu\text{g/l}$ a 31,06 $\mu\text{g/l}$. Pro selen byly získány hodnoty kontrol 68,12 $\mu\text{g/l}$ a 89,96 $\mu\text{g/l}$. Koncentrace Mn a Se v kontrolním materiálu v každé sérii měření ležely uvnitř deklarovaného rozmezí hodnot kontrolního materiálu.

5.2 Výsledky stanovení koncentrace Se a Mn u pacientů

Koncentrace Mn a Se byly měřeny v likvoru pacientů, kteří byli rozděleni do tří skupin podle diagnóz. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 6, 7 a 8. Hodnoty v tabulkách

jsou uvedeny jako medián \pm SD ($\mu\text{g/l}$). Písmeno „n“ značí počet pacientů v dané skupině. Tučně jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

Tabulka 6. Se a Mn v celém souboru pacientů (děti + dospělí)

	selen ($\mu\text{g/l}$)	mangan ($\mu\text{g/l}$)	n
onkologické dg.	13 \pm 3,9	0,9 \pm 0,6	29
neurologické dg.	12,4 \pm 3,4	0,9 \pm 2,2	26
ostatní dg.	14,4 \pm 2,7	0,6 \pm 0,6	18
Statistická významnost			
	selen	mangan	
onkologické vs. neurologické	p = 0,16	onkologické vs. neurologické	p = 0,39
onkologické vs. ostatní	p = 0,42	onkologické vs. ostatní	p = 0,098
neurologické vs. ostatní	p < 0,05	neurologické vs. ostatní	p = 0,4

Tabulka 7. Se a Mn u dětí

	selen ($\mu\text{g/l}$)	mangan ($\mu\text{g/l}$)	n
onkologické dg.	13 \pm 3,9	1,2 \pm 0,6	23
neurologické dg.	12,6 \pm 3,5	1 \pm 0,7	21
ostatní dg.	14,4 \pm 2,6	0,5 \pm 0,6	12
Statistická významnost			
	selen	mangan	
onkologické vs. neurologické	p = 0,355	onkologické vs. neurologické	p = 0,296
onkologické vs. ostatní	p = 0,308	onkologické vs. ostatní	p < 0,05
neurologické vs. ostatní	p = 0,053	neurologické vs. ostatní	p = 0,231

Tabulka 8. Se a Mn u dospělých

	selen (µg/l)	mangan (µg/l)	n
onkologické dg.	16,2 ± 3,2	0,5 ± 0,3	6
neurologické dg.	12 ± 3,3	0,6 ± 4,9	5
ostatní dg.	14,3 ± 3	0,9 ± 0,4	6
Statistická významnost			
	selen	mangan	
onkologické vs. neurologické	p = 0,198	onkologické vs. neurologické	p = 1
onkologické vs. ostatní	p = 0,571	onkologické vs. ostatní	p = 0,387
neurologické vs. ostatní	p = 0,414	neurologické vs. ostatní	p = 0,749

6 DISKUZE

Cílem práce bylo ověřit možnost stanovení Se a Mn v mozkomíšním moku pomocí atomové absorpční spektrometrie.

Stanovení selenu a manganu v likvoru dosud nepatří mezi rutinně prováděné analýzy, a proto nejsou pro koncentrace v likvoru dostupné žádné relevantní analytické údaje (limit detekce, rozmezí koncentrací). Je tedy nutné k získání těchto údajů vycházet z dat publikovaných pro ostatní biologické materiály (sérum, moč, plná krev).

Přehled publikovaných limitů detekce je znázorněn v tabulce 9.

Tabulka 9. Limity detekce selenu a manganu v rutinně vyšetřovaných materiálech (hodnoty LOD jsou uvedeny v $\mu\text{g/l}$)

	sérum	moč	plná krev	čitace
selen	5 - 9,82	1	4	[26; 59; 64]
mangan	0,1 – 0,14	0,06 - 0,1	0,1 – 0,6	[30; 56; 58; 63; 65]

K ověření meze detekce jsme s využitím reagensů a roztoků pro analýzu Se a Mn v séru stanovili limit detekce Se a Mn. Mez detekce Se byla $2,9 \mu\text{g/l}$ a mez detekce pro Mn byla $0,26 \mu\text{g/l}$. Je tedy zřejmé, že stanovené meze detekce odpovídají publikovaným údajům uvedeným v tabulce 9.

Koncentrace stopových prvků v likvoru jsou vyšetřovány v souvislosti s neurologickými onemocněními (Alzheimerova choroba) a onkologickými onemocněními (sarkomy), proto jsme zvolili rozdělení pacientů do skupin dle neurologických a onkologických diagnóz a koncentrace ve skupinách jsme pak porovnali s koncentracemi v kontrolní skupině pacientů s ostatními diagnózami.

Porovnáním hodnot naměřených koncentrací Se a Mn v likvoru jsme zjistili statisticky významný rozdíl v hladinách Se u pacientů s neurologickými diagnózami oproti pacientům s ostatními diagnózami ($12,4$ vs. $14,4 \mu\text{g/l}$, $p < 0,05$, viz tabulka 6). Statisticky významný rozdíl hladin manganu jsme zjistili ve skupině dětí s onkologickými diagnózami oproti srovnávací skupině ostatních diagnóz ($1,2$ vs. $0,5 \mu\text{g/l}$, $p < 0,05$, viz tabulka 7).

Průměrné hodnoty naměřených koncentrací selenu u pacientů s onkologickými diagnózami jsou zvýšené u dospělých v porovnání s dětmi, ale zvýšení není statisticky významné.

Výsledky v tabulce 7 ukazují vyšší koncentrace manganu u dětí s onkologickými a neurologickými chorobami. Hodnoty selenu jsou u dětských pacientů v porovnání s celým souborem srovnatelné.

Naše výsledky jsme dále porovnávali s výsledky studií dalších autorů.

V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky stanovení selenu a manganu v likvoru v naší práci a v jiných studiích.

Tabulka 10. Porovnání koncentrací selenu a manganu u neurologických diagnóz

název studie	skupina	průměr ± SD (µg/l)		statistická významnost	použitá metoda
		Se	Mn		
Meseguer, I. a kol. (1998) [52]	Alzheimer	11,4 ± 7,8	-	nehodnocena	ETA-AAS
	KS	13,3 ± 7,0	-		
Gazzaniga a kol. (1992) [60]	Parkinson	-	6,0 ± 1,3	NS	ETA-AAS
	KS	-	5,7 ± 1,8		
Jiménez-Jiménez a kol. (1998) [60]	Parkinson	-	1,2 ± 0,98	NS	ETA-AAS
	KS	-	0,88 ± 0,76		
Bocca a kol. (2006) [60]	Parkinson	-	0,69 ± 0,42	NS	SF-ICP-MS
	KS	-	0,95 ± 0,39		
Aguilar a kol. (1998) [60]	Parkinson	17,9 ± 12,3	-	NS	ETA-AAS
	KS	13,5 ± 8,2	-		
Qureshi a kol. (2006) [60]	Parkinson	22,7 ± 2,1	-	S >	ETA-AAS
	KS	14,2 ± 1,8	-		
Forte, G. a kol. (2004) [53]	Parkinson	-	0,63 ± 0,43	NS	SF-ICP-MS
	KS	-	0,85 ± 0,36		
Gerhardsson, L. a kol. (2008) [61]	Alzheimer	1,8*	0,61*	S (Mn)	ICP-MS
	Alzheimer + cévní změny	1,8*	0,63*		
	KS	1,9*	0,73*		
Naše výsledky	Celý soubor	12,6 ± 3,4	1,3 ± 2,2	S < (Se)	ETA-AAS
	Ostatní (KS)	14,8 ± 2,7	0,8 ± 0,6		

KS = kontrolní skupina

NS = nesignifikantní rozdíl mezi koncentracemi

S = signifikantní rozdíl mezi koncentracemi

S < = signifikantně nižší

S > = signifikantně vyšší

* Výsledky takto označené jsou uvedeny jako medián (µg/l).

Rozmezí středních hodnot ve vybraných studiích je 11,4 µg/l – 22,7 µg/l pro selen a 0,63 µg/l – 6 µg/l pro mangan. Je tedy zřejmé, že naše výsledky jsou srovnatelné.

Pro porovnání koncentrací u onkologických pacientů byla použita pouze jedna relevantní práce El-Yazigiho a kol. [62]. Autoři uvádějí koncentrace Se v rozmezí 18,4 µg/l – 157 µg/l v závislosti na diagnóze, typu tumoru (benigní tumory, maligní tumory) a věku pacientů. Tyto koncentrace se významně neliší od koncentrací stanovených v kontrolní skupině (19,1 µg/l) [62]. Výsledky prezentované v této studii se zdají být vyšší oproti výsledkům získaným v naší práci, ale autoři zde použili podrobnější dělení jednotlivých maligních a benigních tumorů.

Vyšší hodnoty selenu v rámci onkologických diagnóz jsme naměřili u dospělých, oproti skupině dětí (16,2 µg/l vs. 13 µg/l). Rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou nejsou významné ($p = 0,571$; $p = 0,308$).

Statisticky významný rozdíl v koncentracích manganu jsme zjistili u dětí s onkologickými diagnózami oproti skupině ostatních diagnóz (1,2 µg/l vs. 0,5 µg/l, $p < 0,05$). Vzhledem k tomu, že vyšetření koncentrace Mn v likvoru u pacientů s onkologickými diagnózami dosud nebylo dokumentováno, lze tyto výsledky považovat za zcela unikátní a jistě by mohly být využity k dalšímu podrobnému studiu.

Výsledky práce je nutné interpretovat s přihlédnutím k některým faktorům (heterogenita souboru pacientů, hodnocení hemolýzy, preanalytické podmínky).

Soubor pacientů, je věkově a diagnosticky heterogenní. Věkové rozmezí pacientů zaujímá (při nízkém počtu jedinců) téměř všechny věkové kategorie a více diagnóz. K těmto aspektům je nutno přihlížet při porovnání výsledků s jinými studii, kde jsou vyšetřovaným souborem pacienti přesně definované věkové kategorie (např. pacienti s Alzheimerovou chorobou).

Hodnocení hemolýzy ve vzorku bylo provedeno pouze vizuálně, nikoliv fotometricky. Nemusely tak být rozpoznány všechny hemolytické vzorky. Vliv hemolýzy na výsledky stanovení nelze prokázat také z toho důvodu, že jako jednoznačně hemolytický byl subjektivně označen pouze jeden vzorek. Výsledky měření tedy nelze posuzovat s ohledem na přítomnost hemolýzy či ikteru ve vzorku. Dalším faktorem by mohla být centrifugace vzorků, která byla před původní analýzou likvoru standardně provedena, ale tento postup již nebyl před analýzou stopových prvků opakován. Doba od provedení centrifugace vzorků do sběru pro účely analýzy stopových prvků představovala cca 1 týden. Také fakt, že vzorky likvoru

nebyly odebrány za účelem analýzy stopových prvků, a nebyl tedy dodržen odběr do speciálních plastových zkumavek určených pro stopovou analýzu, mohl mít významný vliv na výsledky měření.

ZÁVĚR

Ověřili jsme možnost stanovení selenu a manganu v likvoru metodou atomové absorpční spektrometrie. Stanovili jsme mez detekce pro Se 2,9 µg/l a pro Mn 0,26 µg/l. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s publikovanými hodnotami meze detekce Mn a Se v séru.

Na souboru dětí a dospělých pacientů s onkologickými, neurologickými a ostatními (jinými než onkologickými a neurologickými) diagnózami jsme stanovili koncentrace selenu a manganu v likvoru.

Zjistili jsme významné rozdíly v hladinách selenu mezi pacienty s neurologickými a ostatními onemocněními.

Zvýšené hladiny selenu jsme zaznamenali ve skupině pacientů s neonkologickými a neneurologickými diagnózami. Významné rozdíly v koncentracích manganu jsme naměřili u dětí v porovnání ostatními a onkologickými diagnózami, přičemž vyšší koncentrace jsou ve skupině onkologické. Výsledky jsou srovnatelné s publikovanými výsledky jiných studií.

Stanovení selenu a manganu v mozkomíšním moku má diagnostický význam u vybraných skupin pacientů.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
CCD	zařízení s vázanými náboji
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPASV	diferenční pulzní anodická voltametrie
ETA-AAS	AAS s elektrotermickou atomizací
FAAS	plamenová AAS
FT3	volný trijodtyronin
FT4	volný tetrajodtyronin
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	redukováná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
HG-AAS	AAS s hydridovou technikou
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ID-MS	izotopová diluční hmotnostní spektrometrie
LOD	limit detekce
LOH	lipidový alkohol
LOOH	lipidový hydroperoxid
NAA	neutronová aktivační analýza
NADH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADP ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
PIXE	částicemi vyvolaná rentgenová emise
SD	směrodatná odchylka
SF-ICP-MS	ICP-MS se sektorovým polem
SOD	superoxiddismutáza
TR-RF	reflexní rentgenová fluorescence
TSH	thyreotropní hormon
T ₃	trijodtyronin

T ₄	tetraiodtyronin (tyroxin)
UV	ultrafialový
VIS	viditelný
XRF	rentgenová fluorescenční analýza
Δ	delta; rozdíl absorbancí

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. CHROMÝ, Vratislav a Miroslava BITTOVÁ. Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně. 2., přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 331 s. ISBN 978-809-0453-937.
2. DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant. 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2011, 253 s. ISBN 978-80-87192-18-4.
3. ŠTERN, Petr a Miroslava BITTOVÁ. Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia. 2., upr. vyd. Brno: Univerzita Karlova, 2011, 269 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4619-798.
4. KVASNIČKOVÁ, Alexandra a Miroslava BITTOVÁ. Minerální látky a stopové prvky: esenciální minerální prvky ve výživě. 1. vyd. Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998, 269 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-851-2094-1.
5. PASSWATER, Richard A. a Miroslava BITTOVÁ. O selenu: esenciální minerální prvky ve výživě. 1. vyd. Praha: Pragma, 1999, 127 s. Pragma o zdraví. ISBN 80-720-5902-5.
6. ZADÁK, Zdeněk. Magnézium a další minerály, vitaminy a stopové prvky ve službách zdraví. 1. vyd. Břeclav: Adamira, 2010, 79 s. ISBN 978-80-904217-0-7
7. ROEDIGER-STREUBEL, Stefanie a Miroslava BITTOVÁ. Minerální látky a stopové prvky: esenciální minerální prvky ve výživě. Vyd. 1. Praha: Ivo Železný, 1997, 158 s. Knížky dostupné každému. ISBN 80-237-3490-3.
8. Merck. Stérimar. [online]. [cit. 2013-12-15]. Dostupné z: <http://www.sterimar.cz/o-sterimaru/stopove-prvky>
9. Ceva Education. [online]. [cit. 2013-12-19]. Dostupné z: http://www.ceva-edu.cz/pluginfile.php/3583/mod_resource/content/3/V%C3%A1pn%C3%ADk%2C%20ho%C5%99%C4%8D%C3%ADk%2C%20fosfor%2C%20%C5%BEelez%20a%20stopov%C3%A9%20prvky_CEVA_2013_kv.pdf
10. VÁVROVÁ, Jaroslava. [online]. [cit. 2013-12-15]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVABL.htm

11. VÍTEK, Libor. Sportvital. [online]. 2010-08-31. [cit. 2013-12-15]. Dostupné z: <http://www.sportvital.cz/zdravi/vyziva-a-zdravi/stopove-prvky/k-cemu-slouzi-stopove-prvky-v-lidskem-tele>
12. American Thyroid Association. [online]. 2012-06-04. [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://www.thyroid.org/iodine-deficiency>
13. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. [online]. 2011-06-24. [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/Iodine-QuickFacts>
14. U.S. National Library of Medicine. Medline Plus. [online]. 2013-12-23. [cit. 2013-12-29]. Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/hyperthyroidism.html>
15. HAVLÍK, Jaroslav a MAROUNEK. Živiny a živinové potřeby člověka: učebnice pro studenty ČZU v Praze. Vyd. 1. V Praze: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2012, 131 s. ISBN 978-80-213-2269-1.
16. HOLOUBKOVÁ, Martina. Chrom ve výživě člověka. Brno, 2010. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/176827/lf_b/Chrom_ve_vyzive_cloveka.txt. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta. Vedoucí práce RNDr. Jiří Totušek, CSc.
17. U.S. National Library of Medicine. Medline Plus. [online]. 2010-01-09. [cit. 2013-12-27]. Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a681039.html>
18. LEVY, Joel. Boeing v pavoučí síti a dalších 99 analogií ze světa vědy. 1. vyd. Praha, 2012, 224 s. ISBN 978-80-247-4322-6.
19. Oregon State University. Linus Pauling Institute, Micronutrient Research for Optimum Health. [online]. 2009-01-22. [cit. 2014-01-14]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium> a <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/manganese/>
20. The World's Healthiest Foods. whfoods.org. [online]. [cit. 2014-01-15]. Dostupné z: <http://www.whfoods.com/genpage.php?dbid=95&tname=nutrient>
21. DUDKOVÁ, Barbora. Vliv oxidativního stresu na kvalitu a fertilizační schopnost spermíí savců. Praha, 2011. Dostupné z: https://www.natur.cuni.cz/biologie/zoologie/archiv/bakalarky_jaro_2011/dudkova.pdf. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

22. KOHOUTKOVÁ, Nina. Obsah toxických a esenciálních prvků v biopotravinách a jejich porovnání s běžnými potravinami. Brno, 2009. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/xmlui/bitstream/handle/11012/11408/Obsah%20toxick%C3%BDch%20a%20esenci%C3%A1ln%C3%ADch%20prvk%C5%AF%20v%20biopotravin%C3%A1ch%20a%20jejich%20porovn%C3%A1n%C3%AD%20s%20b%C4%9B%C5%BEEn%C3%BDmi%20potravinami.pdf?sequence=1>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta. Vedoucí práce Ing. Eva Vitoulová, Ph.D.
23. RACEK, Jaroslav. Krevnicentrum.cz. [online]. [cit. 2014-01-17]. Dostupné z: <http://www.krevnicentrum.cz/laboratorni-prirucka/BOJRAAI.htm>
24. University of Maryland Medical Center. Manganese. [online]. 2011-10-07 [cit. 2014-01-17]. Dostupné z: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/manganese>
25. ZIMA, Tomáš a kol. Laboratorní diagnostika. 3. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013, 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2.
26. MILDE, D. a kol. Laboratorní přístroje a postupy; Optimalizace podmínek stanovení selenu v krevním séru atomovou absorpční spektrometrií. Olomouc: 2001-06-26 [online]. [cit. 2014-03-12] Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002_08_06.pdf
27. Analytik Jena AG. Fundamentals, Instrumentation and Techniques of Atomic Absorption Spectrometry. Německo. [online]. [cit. 2014-04-04] Dostupné z: <http://www.scribd.com/doc/24668309/42/Deuterium-background-correction>
28. VÁVROVÁ, J. a ŠTERN P. Internetový přístup ke zdravotním informacím pacienta. [online]. [cit. 2014-01-18]. Dostupné z: <http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/JVAFC.htm>
29. JEDLIČKA, M., Česká a Slovenská společnost pro fotoniku. Fotonásobiče (1). Světlo: časopis pro světelnou techniku a osvětlování. Praha, 2009. Č. 6, s. 51 – 52. [online]. [cit. 2014-01-04]. ISSN 1212-0812. Dostupné z: <http://www.odbornecasopisy.cz/res/pdf/40235.pdf>
30. TŮZEN, M. Determination of some trace elements in whole blood and serum by GFAAS. Chemistry Department, Faculty of Science and Arts, Gaziosmanpasa University, Tokat (Turecko): 1994 [online]. [cit. 2014-03-07] Dostupné z: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=13958807>
31. SPĚVÁČKOVÁ, V. a KNOTKOVÁ J. Prvková analýza klinických materiálů – aplikace elektrotermické atomové absorpční spektrometrie. Chemické Listy 92,

- Praha, 1998. s. 287 – 293. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_287-293.pdf
32. SPĚVÁČKOVÁ, V. a kol. Biologický monitoring v České republice – stopové prvky a profesionálně neexponovaná populace. Časopis Klinické biochemie, Metabolismus. [online]. 2011 [cit. 2014-01-13]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-2/KBM-2-11-101-Spevackova.pdf>
33. PROKSOVÁ, Kateřina. Studium distribuce prvků v močových kamenech s využitím laserové ablace ve spojení s ICP-MS. Brno, 2011. [online]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/211814/prif_m/Katerina_proksova_diplomova_prace_final.txt. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Karel Novotný, Ph.D.
34. MESTEK, O. Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací. Pracovní text pro Podzemní výukové středisko JOSEF. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2010. [online]. [cit. 2014-01-20] Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ETA_Win_2010.pdf
35. NĚMCOVÁ, Irena, ČERMÁKOVÁ, Ludmila a RYCHLOVSKÝ, Petr. Spektrometrické analytické metody I. 1.vyd. Praha: Karolinum, 1997, 166 s. Univerzita Karlova. ISBN 80-718-4365-2.
36. JABOR, A. a kolektiv. Vnitřní prostředí. 1. vyd. Praha: Grada, 2008, 560 s. ISBN 978-80-247-1221-5.
37. KOMÍNKOVÁ, J. a MESTEK, O. Atomová absorpční spektrometrie. Aktualizace textu Atomová absorpční spektrometrie; Návod pro laboratorní cvičení z analytické chemie II, J. Krofta a kol., VŠCHT Praha, 1997. [online]. [cit. 2014-01-20] Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
38. KUKAČKA, Jiří, KLAPKOVÁ Eva a KOTAŠKA Karel. Bioanalytická chemie v příkladech a cvičeních. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1853-1.
39. Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii: [seminář]. Praha, 2007, 148 s. VŠCHT. [online]. [cit. 2014-01-21]. ISBN 978-80-86238-33-3. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Inovace.pdf>
40. MILDE, David. Atomová absorpční spektrometrie. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2005-2010. [online]. [cit. 2014-01-20] Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/vmach-02-1349071108.pdf>

41. Agilent Technologies, Inc. 2006-2010 a 2012. Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers. 8. vyd., 2012. 8510231600. [online]. [cit. 2014-01-21] Dostupné z: http://hpst.cz/sites/default/files/uploaded_files/gta_analytical_methods_0848.pdf
42. KOPLÍK, Richard. Atomová spektrometrie. Praha: VŠCHT. [online]. [cit. 2014-01-23] Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~koplikr/Atomov%C3%A1%20%20spektrometrie.pdf>
43. Atomová absorpční spektroskopie. Univerzita Palackého v Olomouci. Skripta. [online]. [cit. 2014-01-23] Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/9_AAS.pdf
44. THOMAS, L. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. 1st ed. Frankfurt am Main: TH-Books, c1998, 1527 s. ISBN 39-805-2154-0.
45. BRODSKÁ, H., KAZDA, A., VALENTA, J. Stopové prvky v kritických stavech. Část 2: měď a selen. Klin. Biochem. Metab., 2013, roč. 21 (42), č. 4, s. 203-207. [online]. [cit. 2014-02-05] Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=casopisy--kbn--casopisy-kbn-archiv>
46. KAZDA, A., BRODSKÁ, H. Stopové prvky v kritických stavech. Část 1: zinek a železo. Klin. Biochem. Metab., 2013, roč. 21 (42), č. 4, s. 197-202. [online]. [cit. 2014-02-06] Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=casopisy--kbn--casopisy-kbn-archiv>
47. AVERILL A. Bruce, ELDREDGE, Patricia. 2012 Book Archive. Essential Elements for Life. Principles of General Chemistry. [online]. [cit. 2014-02-07] Dostupné z: <http://2012books.lardbucket.org/books/principles-of-general-chemistry-v1.0m/s05-08-essential-elements-for-life.html>
48. JIRÁKOVÁ, Ludmila a ŠVÉDA, Martin. Transport elektronů a oxidativní fosforylace. Praha: VŠCHT, Chemicko-inženýrská fakulta. [online]. [cit. 2014-02-01] Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/II_8_OPPA.pdf
49. SLOAN, Joshua. Copper. Medscape. [online]. [cit. 2014-02-01] Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/2087780-overview#showall>
50. NIELSEN, H. Forrest. Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: An Update. Ultratrace Elements of Possible Importance for Human Health: An Update. Agricultural Research Service, Grand Forks Human Nutrition Research Center, Grand Forks, ND 58202. California Earth Minerals, 2008. [online]. [cit. 2014-02-02]

Dostupné z: <http://www.californiaearthminerals.com/media/hyper-trace-elements-and-disease-v101.pdf>

51. CABALLERO, B. Guide to Nutritional Supplements. Editor Lothar Thomas. Oxford, UK: Elsevier/Academic Press, c2009, 172 s. ISBN 01-237-5109-8. (Nielsen, F.) [online]. [cit. 2014-01-30] Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=_VjxiHvdlOQC&pg=PA397&lpg=PA397&dq=all+Ultratrace+elements&source=bl&ots=4XrKw8a9Af&sig=WF OEys_787bw3OSv9ZjFll-q4YE&hl=cs&sa=X&ei=nLDuUsPEDqKL4AT7yYGoAQ&ved=0CEcQ6AEwBjgK#v=onepage&q=all%20Ultratrace%20elements&f=false
52. MESEGUER, I. a kol. Cerebrospinal fluid levels of selenium in patients with Alzheimer's disease. Madrid: 1998 [online]. [cit. 2014-12-21] Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s007020050160#page-1>
53. FORTE, G. a kol. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine in patients with Parkinson's disease. Řím: 2004-03-19 [online]. [cit. 2014-12-21] Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00702-004-0124-0#page-1>
54. BIOLABTECH. [online]. [cit. 2014-02-01] Dostupné z: http://biolabtech.wz.cz/navody_KATA.pdf
55. RIDDLE, D. Feature Article: Coral Coloration: Fluorescence: Part 1. [online]. [cit. 2014-02-03] Dostupné z: <http://www.advancedaquarist.com/2010/2006/9/aafeature>
56. TING-WAN, L. a kol. Direct and Simultaneous Determination of Copper, Chromium, Aluminum, and Manganese in Urine with a Multielement Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer. Thajwan: 2001-08-01 [online]. [cit. 2014-03-02] Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac010319h>
57. BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. The Scripps Research Institute, 1996. [cit. 2014-02-02]. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-879X1997000200001&script=sci_arttext
58. Fakultní nemocnice v Motole, Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN v Motole. Standardní operační postup - metodický č. VSOPM_8ÚKBP_198/2008-1. Stanovení manganu v krvi, séru a moči metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací. Praha: 2008-01-11, 1. verze.
59. Fakultní nemocnice v Motole, Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN v Motole. Standardní operační postup - metodický

- č. VSOPM_8ÚKBP_168/2008-1. Stanovení selenu v séru metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací. Praha: 2008-01-11, 1.verze.
60. SPEZIALI M., DI CASA M. Minor and Trace Elements in Cerebrospinal Fluid of Parkinson's Patients – Suggestions After a Critical Review of the Analytical Data. Itálie: 2011-12-19 [online]. [cit. 2014-03-17]
Dostupné z: www.intechopen.com/books/diagnostics-and-rehabilitation-of-parkinson-s-disease/minor-and-trace-elements-in-cerebrospinal-fluid-of-parkinson-s-patients-suggestions-after-a-critical
61. GERHARDSSON, L. a kol. Metal Concentrations in Plasma and Cerebrospinal Fluid in Patients with Alzheimer's Disease. Göteborg (Švédsko): 2008-05-05 [online]. [cit. 2014-03-19]
Dostupné z: <http://www.karger.com/Article/Fulltext/129365>
62. EL-YAZIGI, A. a kol. Concentrations of Ag, Al, Au, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb, and Se in Cerebrospinal Fluid of Patients with Cerebral Neoplasms. 1984-08-30 [online]. [citace: 2014-03-28]
Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/30/8/1358.full.pdf+html>
63. LUNA, A. S. a kol. Atomic Spectroscopy; Determination of Mn in Whole Blood and Urine by Graphite Furnace AAS Using Different Modifiers. Brazílie: květen/červen 1999 [online]. [cit. 2014-03-22]
Dostupné z: <http://perkinelmer.co.kr/files/AP00115.pdf#page=32>
64. ČERNÁ, M. a kol. Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí; Odborná zpráva za rok 2005. Státní zdravotní ústav Praha: červen 2006 [online]. [cit. 2014-03-04]
Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/biomonitoring/biologic_ky_monitoring_05.pdf
65. SUBRAMANIAN, K. S. a kol. Graphite furnace atomic absorption spectrometry with nitric acid deproteinization for determination of manganese in human plasma. American Chemical Society: listopad 1985 [online]. [cit. 2014-03-17]
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00290a012>