



**BIOLÓGIAI ANYAGOK NYOMELEM ANALITIKÁJÁNAK  
FEJLESZTÉSE**  
*Development of Trace Analytical Methods of Biological Samples*

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Dombovári János**

Témavezető:

Dr. Papp Lajos  
professor emeritus

Konzulens:

Dr. Varga Zsuzsa

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Kar  
Debrecen, 2004.

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. Bevezetés</b> .....   | <b>3</b>   |
| <b>2. Irodalmi összefoglalás</b> .....  | <b>5</b>   |
| <b>3. Célkitűzések</b> .....  | <b>18</b>  |
| <b>4. A kísérletekhez használt vegyszerek, eszközök, műszerek</b> .....                                 | <b>19</b>  |
| <b>4.1. Felhasznált vegyszerek és minták</b> .....  | <b>19</b>  |
| <b>4.2. Alkalmazott eszközök és berendezések</b> .....  | <b>21</b>  |
| <b>5. Eredmények és értékelésük</b> .....   | <b>24</b>  |
| <b>5.1. Mintavételi és –előkészítési módszerek kidolgozása</b> .....                                    | <b>24</b>  |
| 5.1.1. Hajminták.....   | 24         |
| 5.1.2. Vér-, szérum-, és plazmaminták előkészítése .....  | 48         |
| 5.1.3. Kis mennyiségű referencia minták roncsolása és analízise .....                                   | 55         |
| <b>5.3. Az alumínium lehetséges forrásai a műveseállomáson</b> .....                                    | <b>60</b>  |
| 5.3.1. A víztisztító berendezés .....   | 60         |
| 5.3.2. A dialízishez használt víz.....  | 63         |
| <b>5.4. Haj- és vérminták nyomelem összetételének vizsgálata</b> .....                                  | <b>65</b>  |
| <b>5.5. Kontroll személyek és hemodialízis kezelésben részesülő betegek szérumának vizsgálata</b> ..... | <b>72</b>  |
| 5.5.1. Referencia tartományok megállapítása a vizsgált nyomelemekre .....                               | 72         |
| 5.5.2. Hemodializált betegek szérumának nyomelem összetétele .....                                      | 76         |
| 5.5.3. A dialízis kezelés hatása a szérum nyomelem koncentrációjára.....                                | 80         |
| 5.5.4. A diagnózis és a nyomelem státusz összefüggései .....  | 95         |
| 5.5.5. A mért nyomelem koncentrációk és néhány biokémiai paraméter közti összefüggés .....              | 97         |
| <b>6. Összefoglalás</b> .....   | <b>104</b> |
| <b>7. Summary</b> .....   | <b>107</b> |
| <b>8. Irodalomjegyzék</b> .....   | <b>111</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás</b> .....  | <b>115</b> |

### 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi néhány évtizedben kiemelkedő fontosságúvá vált a különféle biológiai, illetve humán eredetű minták fő- és nyomelem analitikai vizsgálata [1]. A humánbiológiai minták nyomelem analízisével sok esetben megbízhatóan felderíthetők a munkahelyi ártalmak, mérgezések, környezeti ártalmak, illetve az analízis eredményeinek felhasználásával az egészségi állapot jellemezhető [2]. E vizsgálatok fontosságát fokozta az a felismerés, mely szerint az emberi szervezet működésében, a biokémiai folyamatokban kulcsszerepet játszanak különböző nyomelemek, melyek kis mennyiségben szükségesek az emberi szervezet zavartalan működéséhez, és hiányuk, illetve a normál tartomány fölötti koncentrációjuk komoly működési problémákat okoz. Ezért fontos, hogy megfelelően érzékeny analitikai kémiai módszerekkel időről-időre ellenőrizzük az egyén nyomelem státuszát. A biológiai minták nyomelem analízise azonban komoly kihívást jelent az analitikus számára. A minták nagy szervesanyag tartalma miatt roncsolás vagy hamvasztás szükséges a szerves komponensek analízise előtt, a kis nyomelem koncentráció pedig jól megtervezett, speciális mintaelőkészítést, és érzékeny analitikai módszer alkalmazását teszi szükségessé [3-5].

Ilyen vizsgálatok diagnosztikai célból való alkalmazása az egészséges emberek rendszeres vizsgálatán túl különösen fontos olyan betegek esetében, akiknél a betegség vagy az alkalmazott kezelés befolyásol(-hat)ja a makro- és mikroelemek koncentrációját a szervezetben. Közülük kiemelten fontosak a rendszeres hemodialízis (HD) kezelés alatt álló betegek, akiknél az alkalmazott gyógyszerek, ill. a művese kezelés hosszú távú változásokat idézhet elő a szervezet nyomelem státuszában. Esetükben ez az esszenciális elemek koncentrációjának drasztikus megváltozását, ill. olyan toxikus elemek megjelenését és felhalmozódását jelentheti, mint pl. az alumínium [6-8]. Az alumínium mérgező volta bizonyított, és felhalmozódása kapcsolatban lehet különböző betegségekkel (pl. Alzheimer-kór) [9]. E betegek esetében a nyomelemek (elsősorban az alumínium) koncentrációjának vizsgálata fejlett egészségügyi kultúrával rendelkező (főleg Nyugat-európai) országokban egyre szélesebb körben alkalmazott diagnosztikai

módszer a nyomelem státusz változásának vizsgálatára. Ilyen célból Magyarországon hasonló átfogó vizsgálatokat még nem végeztek.

Analitikai vizsgálatok során alapvető fontosságú a megfelelő minta kiválasztása, ill. a helyes mintavétel. A humán (nyom-)elem analitikában mintaként a leggyakrabban vért, szérumot, plazmát, vizeletet, haját, körmöt, esetleg egyéb szöveteket használnak [10]. Mivel ezek nyomelem koncentrációja között akár nagyságrendi különbségek is lehetnek, ezért a vizsgált elem határozza meg azt, hogy melyik mintatípust alkalmazzák. A különböző minták kiválasztását befolyásolja még a rendelkezésre álló mintavételi-, előkészítési- és vizsgálati módszer, valamint diagnosztikai alkalmazás esetén az elérhető referencia tartományok megbízhatósága. A mintavétel és -előkészítés során igen gondosan kell eljárni annak érdekében, hogy a minták nyomelem veszteségét vagy szennyeződését elkerüljük. Tekintve a minták bonyolult összetételét, nagy szervesanyag-tartalmát, és emiatt a bonyolult, gyakran több lépésből álló mintaelőkészítést, ez nehéz feladat. Az esszenciális elemek gyakran igen alacsony ( $\mu\text{g/L}$  - szub- $\mu\text{g/L}$ ) koncentrációja miatt érzékeny és jól reprodukálható analitikai módszert kell alkalmazni, az eredmények értékeléséhez és gyakorlati hasznosításához pedig az adott szakterületben jártas orvos közreműködése szükséges. A gyakorlati hasznosítás és diagnosztikai alkalmazás fontos feltétele az is, hogy az eredmények értékeléséhez megfelelő, nemzetközileg elfogadott referencia tartományok álljanak rendelkezésre, melyek segítségével a meghatározott koncentrációk normális vagy attól eltérő volta eldönthető [11,12].

A fentiek alapján értekezésemben humánbiológiai minták mintavételének, előkészítésének és analitikai vizsgálatának fejlesztésével és a különböző lehetőségek összehasonlításával olyan módszert kívántam kidolgozni, amely a klinikai gyakorlatban használt, megbízható adatokon alapuló referencia tartományok segítségével lehetőséget teremt mind az egészséges személyek nyomelem státuszának vizsgálatára, mind pedig a hemodialízis kezelés alatt álló betegek diagnosztikai célú vizsgálatára.

### 2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS

Az irodalmi bevezetőben és az értekezés további fejezeteiben a következő rövidítéseket alkalmaztam:

|           |  |
|-----------|--|
| EDTA      | etilén-diamin-tetraacetát  |
| ETAAS     | Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, Elektrotermikus atomabszorpciós spektrometria   |
| FAAS      | Flame Atomic Absorption Spectrometry, Lángatomabszorpciós spektrometria  |
| GFAAS     | Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Grafitküvettás atomabszorpciós spektrometria  |
| HD        | hemodialízis   |
| IAEA      | International Atomic Energy Agency, Nemzetközi Atomenergia Ügynökség   |
| ICP-MS    | Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Induktíve csatolt plazma tömegspektrometria  |
| ICP-OES   | Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, Induktíve csatolt plazma optikai emissziós spektrometria                               |
| ID-ICP-MS | Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Izotóphígításos induktíve csatolt plazma tömegspektrometria                       |
| LC-ICP-MS | Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Folyadékromatográfiával kapcsolt induktíve csatolt plazma tömegspektrometria |
| NAA       | Neutron Activation Analysis, Neutronaktivációs analízis  |
| PIXE      | Particle Induced X-Ray Emission, Részecskeindukált röntgenemisszió   |
| TMAH      | Trimethyl Ammonium Hydroxide, Trimetil-amin vizes oldata   |
| ZAAS      | Zeeman Atomic Absorption Spectrometry, Zeeman háttérkorrekciós atomabszorpciós spektrometria   |

A humán nyomelem státusz vizsgálatának növekvő igénye, alkalmazásának egyre jelentősebb orvosbiológiai szerepe több tényezőnek köszönhető: (1) felismerték, hogy bizonyos betegségek a nyomelemek rendellenes metabolizmusával szoros összefüggésben állnak (pl. Wilson-, Menkes-, Danbolt-kór, stb.); (2) megállapították, hogy a táplálkozási problémák komoly hatással vannak a szervezet nyomelem státuszára; (3) az egyre intenzívebb ipari, mezőgazdasági tevékenység megnöveli bizonyos elemek környezeti vagy munkahelyi expozícióját; (4) megfigyelték, hogy bizonyos betegségek (pl. myokardiális infarktus, máj cirrhosis, veseműködési problémák) a nyomelem státusz megváltozásával járnak [3].

Az emberi szervezet nyomelem koncentrációjának meghatározására olyan minták használhatók, melyek a szervezet károsítása nélkül a páciensektől viszonylag egyszerűen gyűjthetők, és mintavételük, tárolásuk nem igényel bonyolult eszközöket, módszereket. Erre a célra általában vért (szérumot, plazmát), vizeletet [13,15], haját, fogat, ill. körmöt [14] használnak. Fentiek közül a vizeletvizsgálat csak annak elemzésére alkalmas, hogy a szervezet milyen nyomelemeket veszít el, ill. választ ki. A fog alkalmazása a nyomelem státusz rendszeres vizsgálatára nem megoldható. A köröm nyomelem tartalmáról, a normál koncentrációkról, valamint a köröm exogén forrásból származó szennyeződésének lehetőségeiről igen kevés információ áll rendelkezésre. A publikációk, diagnosztikai módszerek és eredmények túlnyomó része ezen okok miatt a haj és vér vizsgálatán alapul [10].

A teljes vér, szérum és plazma napjainkban a legelterjedtebben alkalmazott minták a gyakorlatban mind klinikai paraméterek, mind a nyomelem státusz vizsgálatára. E minták előnye (és egyben hátránya), hogy az aktuális nyomelem státuszról szolgáltatnak információt; további hátrányuk, hogy a kapott információ csak az extracelluláris tér nyomelem koncentrációját tükrözi [16,17]. További problémát jelent, hogy a mintavétel csak steril körülmények között, szakképzett személy által végezhető, a minta tárolás során hűtést vagy fagyasztást, ill. tartósítást igényel, valamint a vérmintákkal végzett munka során a fertőzésveszély miatt szigorú biztonsági szabályokat kell betartani. A haj ezzel szemben a szervezetben előforduló nyomelemeket növekedése során időben folyamatosan akkumulálja, ezért vizsgálatával a korábbi néhány hónap nyomelem státusza vizsgálható. Hajminták esetében a mintavétel egyszerű, a minták tárolása szobahőmérsékleten megoldható, és a velük végzett munka veszélytelen [16, 18-20].

Az analízis első kritikus lépése a mintavétel, a kapott eredmények hibájának egy része e lépés rovására írható [21]. Fontos tehát, hogy a mintavétel során a minták ne szennyeződjenek a környezet vagy a mintavétel eszköztől. Vérminták esetében Versieck és Cornelis arra hívták fel a figyelmet, hogy a króm, vas, mangán és nikkkel koncentrációja megnövekedhet a vérben a mintavétel során, mert az alkalmazott rozsdamentes acél túból ezek az elemek kioldódhatnak [3,15]. Ennek kiküszöbölésére a szerzők szilikon bevonatú acél tű vagy műanyag vérvételi kanül alkalmazását javasolják. Hajminták esetében rögzíteni kell a mintavétel helyét, mivel a haj különböző területeit nem egyforma mértékben érik a környezeti hatások, kozmetikumok. Nyomelem analízis céljából ezért általában a tarkóról vesznek mintát, mely a szennyező forrásoktól viszonylag védett [18,22]. A mintavétel eszköze a vérmintákhoz hasonlóan itt is kritikus. A szennyeződés elkerülése érdekében Caroli és munkatársai titán-nitrid bevonatú szike [22], Manson és Zlotkin műanyag vagy kvarc vágóeszköz alkalmazását javasolták [17]. Ezen eszközök azonban drágák, sérülékenyek és nehezen hozzáférhetők, ezért rutinszerű alkalmazásuk nem terjedt el.

A tárolás során szintén szennyeződés érheti a mintát, ezért a tárolásra szolgáló edényeket előzetesen meg kell vizsgálni annak megállapítására, hogy oldódhat-e ki szennyeződés az edényből, ill. kötődhetnek-e meg elemek az edény falán a mintából. Ez különösen a vérminták esetében okozhat problémát, hajmintáknál még hosszabb idejű tárolás esetén sem kell a nyomelem koncentrációnak, vagy a minta szerkezetének észlelhető változásával számolni [10,16,23]. Vérminták esetében további probléma a tartósító, ill. alvadásgátló szerek (Na-heparin, Na-citrát, EDTA, stb.) gyakran nagy szennyezőanyag koncentrációja [3].

Hajminták esetében az előkészítéshez tartozik a mosás, mely mind a mai napig a hajanalízis egyik legvitatottabb és megoldatlan kérdése, az eredmények legnagyobb hibája is ennek rovására írható, és ez a módszer széles körű elterjedésének akadálya. A mosás célja, hogy a hajszálok felületéről analízis előtt minél tökéletesebben eltávolítsuk az exogén eredetű szennyeződések anélkül, hogy a minta endogén összetételét befolyásolnánk. Ez azért is bonyolult, mivel a különböző nyomelemek különböző mobilitású formában, ill. a hajszál eltérő részeiben dúsulhatnak [24], ami azt jelenti, hogy a nem megfelelő mosási művelet nem csak az egyes nyomelemek koncentrációját változtathatja meg, hanem

egymáshoz viszonyított arányukat is. Az irodalomban számos mosási módszert írnak le a szerzők. Az International Atomic Energy Agency ajánlása [16] acetonnal, majd ionmentes vízzel való mosást javasol, mindkettőt legalább 10 percig, keverés mellett, szobahőmérsékleten. Salmela és munkatársai [25] komplexképzővel (1%-os EDTA oldattal), ionos detergenssel (1%-os nátrium-lauril-szulfáttal) és ionmentes detergenssel (1%-os Triton-X100 oldattal) végeztek kísérleteket, és tanulmányozták, hogy néhány elem koncentrációja egymást követő mosási lépések után hogyan változik a hajmintákban. Az IAEA ajánlásával ellentétben azt találták, hogy az aceton alkalmazása nem megfelelő a hajminták tisztítására, a többi módszer pedig eltérő mértékben befolyásolja a vizsgált elemek (Mn, Fe, Cu, Zn, Cd) koncentrációját. Bacsó és munkatársai ionmentes detergenssel [26], ecetsav oldattal és ionmentes vízzel [27], ill. xilollal [28] történő mosást javasoltak az exogén eredetű Ca eltávolítására. Caroli és munkatársai [22] dietil-éter-aceton (3:1) eleggyel, 5%-os EDTA oldattal, majd ionmentes vízzel végzett mosási eljárást ajánlottak a hajminták exogén szennyeződésének eltávolítására. A kiragadott példákból látható, hogy igen nagy eltérések vannak az alkalmazott mosási műveletekben. A legtöbb szerző egyetért azonban abban, hogy tökéletes, az exogén szennyeződést bizonyítottan eltávolító és az endogén nyomelem összetételt nem befolyásoló mosási módszert még nem sikerült kifejleszteni.

Amennyiben a vér- ill. hajminták elemkoncentrációjának meghatározásához oldatmintára van szükség, a mintaelőkészítés következő lépése a roncsolás. A régóta alkalmazott nedves légköri roncsolás és hamvasztás nyomelem analitikai célra a legtöbb elem esetében nem megfelelő, mivel a minta roncsolása során nagy a szennyeződés és az illékony vegyületek miatt bizonyos nyomelemek veszteségének veszélye [5,29]. A minta szennyeződésének és veszteségének megakadályozására napjainkban a legjobban bevált módszer a mikrohullámú roncsolás, melynek több változata használatos. Mikrohullámú készülékbe helyezett zárt, nagynyomású teflonbombákban [29-31,33] illetve fókuszált mikrohullámú sugárással nyitott edényekben [32] különböző savelegyek használatával gyorsan, megbízhatóan roncsolhatók el a nagy szervesanyag tartalmú minták. Koplík és munkatársai [30] különböző savelegyeket használva összehasonlították a mikrohullámú roncsolási módszert a hamvasztással, és azt tapasztalták, hogy az alkalmazott kb. 500 mg növényi eredetű referenciamintából a vizsgált nyomelemek

többségénél a hamvasztással előkészített mintákból jelentős (10-75%) veszteség történt, míg a mikrohullámú készülékben zárt rendszerben előkészített minták nyomelem összetétele jól egyezett a szavatolt értékekkel. Hasonló következtetésre jutottak Bohrer és munkatársai 500-1000 µl szérumból [5], Maddedu és Rivoldini 500 mg növény minta [29], Garraud és munkatársai 50 mg biológiai minta [32], Wu és munkatársai 500 mg növény minta [31], valamint Friel és munkatársai 100 mg különféle referenciaminta [33] vizsgálatával. A klinikai gyakorlatban azonban gyakran előfordul, hogy ennél jóval kevesebb (10-20 mg, ill. µl) minta áll rendelkezésre roncsoláshoz és az analízis elvégzésére. Ilyen kis mennyiségű minták roncsolására a mikrohullámú készülékekhez gyártott és használatos 80-100 cm<sup>3</sup> térfogatú teflonbombák módosítás nélkül nem alkalmasak. További probléma, hogy a mikrohullámú készülékek - típustól függően - általában 6-12 minta egyidejű roncsolását teszik lehetővé, ami a rutin alkalmazás során kevésnek bizonyulhat.

Alternatív mintaelőkészítési módszer lehet folyékony minták esetén a hígítás, pl. desztillált vízzel [13,34], híg salétromsavval [35], detergens oldattal [36], ill. a roncsolás trimetil- (vagy tetrametil-) ammónium hidroxid vizes oldatával [4]. Fentiek közül a híg salétromsavval végzett hígítás esetében a nagy szervesanyag tartalmú mintákból fehérjekicsapódás történhet, mely az oldatból nyomelemeket köthet meg. A hígítási módszerek hátránya, hogy alkalmazásuk során mindig számolni kell a mintában maradó szerves mátrix zavaró hatásával és a nyomelemekre amúgy is alacsony µg/L, ng/L-os koncentrációjú minták további hígulásával.

A biológiai minták analízisére alkalmazott irodalmi módszerek igen sokfélék. Főleg szilárd halmazállapotú minták elemzésére alkalmazhatók előnyösen a roncsolás nélküli analitikai módszerek, mint a neutronaktivációs analízis (NAA) [37-39], a részecske-, radioaktív- [26-28], proton-, ill. egyéb forrással indukált [40-48] röntgenemissziós és -fluoreszcenciás analízis (PIXE). E multielemes módszerek komoly előnye, hogy nem igényelnek mintaelőkészítést, a szilárd minták közvetlenül vizsgálhatók. Ward és munkatársai [38] a NAA és ICP-MS módszerek összehasonlítása során azt tapasztalták, hogy az ICP-MS módszer pontosabb és megbízhatóbb eredményeket szolgáltat különösen a nyomnyi mennyiségben jelenlevő elemekre, míg a NAA módszer a nagyobb koncentrációjú elemek esetében ad megbízhatóbb eredményt. A roncsolásmentes módszereket széles

körben alkalmazzák klinikai jellegű kutatásokra. Bacsó és munkatársai [26] röntgenfluoreszcenciás mérések segítségével megállapították, hogy a haj kalcium koncentrációja szoros összefüggésben van a szívbetegségekkel; infarktuson átesett betegek hajából a normál Ca koncentrációnak mintegy felét mérték. Clayton és Wooller [41] valamint Tomza és munkatársai [39] munkahelyi nehézfém expozíciónak kitett munkások hajának elemzése során nagy Cr, Co, As, Se, Zr és Cd koncentrációkról számoltak be. Különböző rákbetegek hajmintáinak vizsgálatával Kwiatek és munkatársai [44] nem találtak jelentős különbségeket a betegek és a kontrollcsoport hajmintáinak nyomelemtartalma között. Yin és munkatársai mérései azonban eltéréseket mutattak a rákos betegek és a kontrollcsoport hajmintáinak Ca, Fe, Ni, Cu és Pb koncentrációiban [46]. Zeng és munkatársai szintén rákos betegek hajmintáinak vizsgálata alapján a Mn, Cu, Zn és As koncentráció, valamint a Cu/Zn arány jelentős eltéréséről számoltak be a kezelés előtt álló betegek és a kontroll csoport között [47]. Az irodalmi adatok fentiekhez hasonló ellentmondásossága miatt minden betegcsoport esetében meg kell vizsgálni, hogy roncsolásmentes módszerek alkalmazhatók-e a felmerült klinikai diagnosztikai probléma megoldására. A módszerek diagnosztikai alkalmazását gátolja továbbá speciális eszközigényük, a rossz kimutatási határok, valamint a gyakran igen hosszú (akár több órás) mérési idő. E módszerek közül a nagy felbontású mikro-PIXE módszer különösen alkalmasnak bizonyult a minták nyomelem eloszlásának tanulmányozására.

A roncsolásmentes módszereknél sokkal elterjedtebben alkalmazzák a biológiai minták nyomelem tartalmának meghatározására a roncsolással járó analitikai módszereket. Leggyakrabban alkalmazott módszerek az FAAS [52], ZAAS [57], ETAAS [5,51,53,56], ICP-OES [13,58-62], GFAAS [63-68] és legújabban az ICP-MS [1,69-73], ID-ICP-MS [74-76], valamint az LC-ICP-MS [77]. Bagliano és munkatársai [52] az FAAS módszert hasonlították össze a GFAAS-el, ill. Hg esetében a hideggőz technikával. Úgy találták, hogy az FAAS módszer ugyanolyan megbízható és pontos, mint a másik két módszer; az általuk vizsgált elemek koncentrációtartománya igen széles volt (0,2-300  $\mu\text{g/g}$ ) a hajmintákban. Az FAAS monoelemes módszer, és jelentős hátránya, hogy kis nyomelem koncentrációk (<0,1  $\mu\text{g/g}$ ) esetében, ill. ultranyomelemzés (<0,01  $\mu\text{g/g}$ ) céljára már nem használható. Az ICP-OES multielemes volta és a kalibráció széles lineáris

tartománya (3-4 nagyságrend) miatt jól használható biológiai minták nyomelemeinek és fő komponenseinek meghatározására is. Caroli és munkatársai [62] ezzel a módszerrel nagy számú nyomelemet vizsgáltak különféle humánbiológiai mintákból (máj, vese, tüdő, haj, szérum) referencia értékek megállapítása céljából. Maddedu és munkatársai az ICP-MS és ICP-OES összehasonlítása során az előbbit a kis koncentrációban jelen levő nyom- és ultranyomelemek meghatározására, míg az utóbbit a főbb komponensek vizsgálatára találták megfelelőnek [29]. Nagy érzékenysége miatt gyakran alkalmazzák biológiai anyagok nyomelemzésére a GFAAS módszert [7,36,63,67,68]. E módszer alkalmazásának előnye, hogy a grafitküvetében megfelelő fűtési program használatával a minta szervesanyag tartalma az atomizálás előtt elroncsolható, így folyékony biológiai minták közvetlen elemzése is lehetséges. Knowles és munkatársai [36] ólmot és kadmiumot határoztak meg hígított vérmintákból, illetve alumíniumot hígított szérum mintákból GFAAS módszerrel, míg Gardiner és munkatársai alumíniumot határoztak meg hígított szérum mintákból [68]. Utóbbi szerzők az érzékenység jelentős javulását figyelték meg alumínium koncentrációjának meghatározása során, amikor a tesztmintaként használt alumínium standard oldathoz  $Mg(NO_3)_2$  oldatot adtak mátrixmódosítóként; a mátrixmódosító hatását azonban a hígított szérum minták esetében nem tudták reprodukálni. Megállapították továbbá, hogy az érzékenység tovább javítható a pirolitikus bevonattal rendelkező grafitcsőbe helyezett L'vov platform alkalmazásával. Karadjova és munkatársai [79] Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni és Pb mérése során jutottak hasonló megállapításra. A szerzők itt N,N-hexametilén-ditiokarbamát hexametilén-ammónium sóját használták mátrixmódosítóként. Constantini és Giordano [55] alumínium meghatározása során különböző mátrixmódosítókat használtak, és megállapították, hogy szérum minták esetében a Triton-X100 tartalmú  $Mg(NO_3)_2$  oldat növelte legnagyobb mértékben az érzékenységet L'vov platformmal kombinálva. A különböző segédanyagok alkalmazása azonban növeli a minták szennyeződésének veszélyét is. Blanusa és munkatársai [7] humán szérum alumínium tartalmának meghatározása során a Triton-X100-at tartalmazó  $Mg(NO_3)_2$  oldattal hígított mintákból néhány esetben igen nagy, akár 200  $\mu g/L$  fölötti alumínium koncentrációt mértek. Mivel az alumínium 50  $\mu g/L$  fölött erősen toxikus, 100  $\mu g/L$  fölött pedig letális lehet, ezért

ezek az adatok valószínűleg a minták előkészítése során történt szennyeződésével magyarázhatók. Napjainkban nyomelem analitikai célra egyre gyakrabban használnak ICP-MS módszert, melyet multielemes volta, kiváló érzékenysége (<ng/g, <pg/L) tesz alkalmassá a klinikai és környezetvédelmi kutatások céljára [69]. E technika jól alkalmazható módszerfejlesztésre és rutin vizsgálatok végzésére is, bár nagy beruházási és üzemeltetési költségei miatt klinikai alkalmazása még nem terjedt el széles körben.

Az adatok kiértékelése során a kapott eredményeket egészséges kontrollok mintáiból megállapított referencia tartományokkal hasonlítjuk össze. Problémát jelent azonban, hogy az eredményeket az egészségi állapoton túl más tényezők is befolyásolhatják. Ezek közül legfontosabb biológiai tényezők a kor és a nem [80-82], míg a környezeti tényezők közül a lakóhely, a foglalkozás és az életmód [83-87]. Zakrgynska-Fontaine és munkatársai [82] a hajminták összetételének a nemtől és életkortól való függését tanulmányozva megállapították, hogy a Ca, Mg, Zn és Cu koncentrációja a nők, míg a Fe és Pb koncentrációja a férfiak hajában a nagyobb. Az Al, Ag, Cu és Co a fiataloktól származó mintákban, a Zn, Ca és Mg pedig felnőtteknél fordultak elő nagyobb koncentrációban. Caroli és munkatársai [22] ezzel szemben referencia tartományok megállapítása során a városi populáció fiatal (15 év alatti) tagjait választották ki, és a kapott értékeket használták összehasonlítási alapként a városi emberek hajmintáinak vizsgálata során. Khassouani és munkatársai [87] a kadmium koncentrációját vizsgálták egészséges személyek vérében, és a marokkói férfiaknál nagyobb értékeket mértek, mint a nőknél. Ezzel szemben a francia alanyok esetében nem volt jelentős eltérés a nemek között; a szerzők ezt azzal magyarázták, hogy a marokkói férfiak túlnyomó része dohányzik, és a megnövekedett kadmium szint ennek, ill. munkahelyi ártalmaknak a következménye.

Limic és Valkovic [81] Zn, Se és Pb koncentrációját, ill. eloszlását vizsgálta hajmintákban, és megállapították, hogy a Se és Pb jelentős része valószínűleg exogén szennyeződés eredménye a mintákban. De Kom és munkatársai [83] bauxitbányában dolgozó munkások szérumának vizsgálata során nem találtak jelentős alumínium koncentráció növekedést a kontroll csoporthoz képest. Moulin és munkatársai [86] alumíniumkohóban dolgozó munkások esetében a halálozási arányt és a rák kialakulásának valószínűségét vizsgálva jutottak hasonló

eredményre. Krauss és munkatársai [84] azonban robbanóanyag gyárban dolgozó munkásokat vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy az alumíniumpor hatására megnő a tüdő fibrosis kialakulásának veszélye. Nuyts és munkatársai [85] a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek esetében hívták fel arra a figyelmet, hogy a dializált személyek mintegy 3 százaléknál a betegség környezeti vagy munkahelyi ártalomra vezethető vissza. Fontos rizikófaktorként az ólom-, réz-, króm-, higany- és ónexpozíciót, valamint a hegesztési füstöt és a szilícium vegyületeket jelölték meg.

Az eredmények kiértékelését nehezíti, hogy az irodalomban igen sok, a fentiekhez hasonló ellentmondás tapasztalható a közölt mérési eredmények és megállapított referencia tartományok között. Még napjainkban is nagy (akár nagyságrendi) eltérések vannak bizonyos elemek egészséges tartományaira vonatkozóan [88-90]. A referencia tartományok nagy részénél az sem dönthető el egyértelműen, hogy a vizsgált személyek orvosi szempontból egészségesek voltak-e és erről meggyőződtek-e a nyomelem analitikai vizsgálatok előtt [89]. Az irodalomban közölt referencia értékeket tehát kellő fenntartással kell fogadni, és célszerű az adott régióra jellemző humán nyomelem koncentrációkat klinikai tesztek alapján egészségesnek bizonyult kontroll személyek mintáinak elemzésével felülvizsgálni az esetleges helyi eltérések megállapítása végett.

A felmerülő problémák ellenére a nyomelem analitikai módszereket egyre szélesebb körben alkalmazzák nem csak a környezeti hatások és egészséges referencia tartományok megállapítására, hanem különböző betegségekben szenvedő alanyok vizsgálatára is. E vizsgálatok célja a nyomelem státusz megváltozásával járó betegségek korai felismerésének elősegítése, lehetőleg még a klinikai tünetek megjelenése előtt, ill. azok biológiai, biokémiai hátterének és következményeinek vizsgálata [9,44,46,47,84,85,91-94]. Shrestha és Caruhra [91] mentálisan retardált gyermekek hajmintáit vizsgálva kimutatta, hogy a minták vas, réz és magnézium koncentrációja kisebb, a kalcium koncentrációja pedig nagyobb volt a kontrollokénál, míg a cink koncentrációja nem különbözött a két csoport mintáiban. Mivel a kontroll személyek is ugyanazon közösségből és korosztályból kerültek ki mint a betegek, ezért a mért különbségek nem magyarázhatók az esetleges környezeti források vagy biológiai tényezők hatásával. Ely és munkatársai [92] a levegőben található szennyezők és a gyerekek tanulási

problémái közötti összefüggéseket vizsgálva megállapították, hogy bár a tanulási problémával küzdő gyerekek hajának nyomelem összetétele különbözik a kontrollokétól (a kontrollokhoz képest a beteg fiúknál nagyobb Se és Cd, a beteg lányoknál nagyobb volt a Se koncentráció), a mért különbségeért a levegőben előforduló szennyezések nem felelősek. Multiplex sclerosisban szenvedő betegek vizsgálatával Ryan és munkatársai [93] megállapították, hogy a betegek hajmintáiban a V és Se koncentrációja szignifikánsan nagyobb, míg a Cu, I, Mn és S koncentrációja szignifikánsan kisebb mint a kontroll mintákban. Oster [94] szívbetegségben szenvedő betegek esetében arról számolt be, hogy nemcsak a betegek és a kontrollok között van szignifikáns különbség, hanem a különböző keringési rendellenességekben szenvedő betegek nyomelem státusza is különbözik egymástól.

A fenti néhány példa is mutatja, hogy e tudományterület, melynek eredményei a betegek életminőségét jelentősen befolyásolhatják, mennyire kevésbé művelt és ismert. Ezek a „fehér foltok” túlnyomórészt az analitikusok és az orvosok nem kielégítő együttműködéséből származnak.

Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem fordul a rendszeres hemodialízis (HD) kezelésben részesülő betegek nyomelem analitikai vizsgálata felé. E betegcsoportnál a veseműködés problémája miatt alkalmazott dialízis kezelés során fokozottan jelentkezik annak a veszélye, hogy a betegeket környezeti forrásokból vagy a dialízis kezelés következtében toxikus nyomelem expozíció éri, vagy a kezelés során vérükből esszenciális nyomelemek mosódnak ki. Hung és munkatársai [95] a HD kezelésben részesülő betegek vizsgálatai alapján megállapították, hogy a dializált betegek vérében nagy az alumínium koncentráció, kicsi a Zn koncentráció, a Cu szintje a normál tartományban van, a Cd, Pb és Hg koncentrációja pedig az egészséges határérték alatti. A kontrollokhoz viszonyítva a HD betegek Al, Cu és Pb szintje nagyobbak, a Zn szintje kisebbnek bizonyult, míg a Cd és Hg koncentrációja hasonló volt a két csoportban. Ez arra utal, hogy a dialízis kezelés hosszú távon az Al, Cu, Pb felhalmozódásával és a Zn kimosódásával jár a szervezetből. Az alumínium, kalcium és cink koncentrációját vizsgálták Marumo és munkatársai [14] haj, köröm és plazma mintákból nem dializált, hemodialízissel és hemofiltrációval kezelt betegek valamint egészséges kontrollok esetében. Vizsgálataik kimutatták, hogy a betegeknél a plazma

alumínium koncentrációja minden esetben nagyobb volt a kontrolloknál mért értékeknél, és a betegek közül a hemodialízissel vagy hemofiltrációval kezeltéknél nagyobb volt, mint a nem kezelt betegeknél, vagyis a betegek esetében a plazmából mérhető megnövekedett alumínium koncentráció a dialízis kezeléssel van összefüggésben. A nagyobb Al-szint a nem dializált és a dializált betegek hajmintáiban is tükröződött. Hasonló eltéréseket tapasztaltak a kalcium koncentrációnál is, míg a betegek plazma Zn koncentrációja kisebb volt, mint a kontrolloké. E megfigyelések is az alumíniumnak a kezelés hatására bekövetkező felhalmozódását és a cink kimosódását valószínűsítik.

Az alumínium a szervezetbe kerülő toxikus nyomelemek közül különösen fontos. Az alumínium a földkéreg egyik leggyakoribb eleme, így bizonyos expozíció elkerülhetetlen az emberek számára. Az alumínium bevitel túlnyomó része szájon át történik, és a naponta bevitt mennyiség egészséges felnőtteknél általában 30-50 mg [96]. Ennek kis része az ivóvízből származik, nagyobb részének forrásai pedig az élelmiszer adalékok (főleg az emulgeálószeresek). Ez a mennyiség nem jelent közvetlen veszélyt az emberi szervezet számára, mivel túlnyomó része az emésztő rendszerből nem szívódik fel, és a szervezetből eltávozik. Priest és munkatársai [97] az alumínium egészséges emberek szervezetében történő megkötődését tanulmányozták úgy, hogy  $^{26}\text{Al}$  izotópot juttattak ivóvízzel a szervezetbe, és vizsgálták a kiürülést. Megállapították, hogy a bevitt  $^{26}\text{Al}$  közel 100%-ban eltávozott a szervezetből az expozíció után 7 nappal, így az orálisan (vízzel, ill. táplálékkal) bevitt alumínium valószínűleg nem befolyásolja jelentősen a szervezet Al-koncentrációját.

A rendszeres hemodialízis kezelésben részesülő betegek esetében azonban az alumínium további forrásai jelennek meg, melyek közül a legfontosabbak a dialízis során használt víz, a dializáló oldatok, infúziók és gyógyszerek. A keringési rendszerbe dialízis során, ill. gyógyszereken keresztül közvetlenül bekerülő alumínium nagy része (akár 85%-a) nem ürül ki a szervezetből, mivel stabil fehérje komplexek formájában - főleg transferrinhez, albuminhoz, citráthoz, glutamáthoz és hisztidinhez kötve - fordul elő [6,96]. Mivel a szervezetbe kerülő és felhalmozódó alumínium súlyos problémákat (idegrendszeri, mozgáskoordinációs zavarok, osteodystrophia, encephalopathia, mycrocytic anemia, stb.) okoz, és eltávolítása dialízissel igen nehéz, ezért az alumínium intoxikáció elkerülésének

legcélravezetőbb módja a megelőzés. Fernández-Martín és munkatársai [8] 1988 és 1996 között több dialízis központban ellenőrizték az erre irányuló törekvéseket Spanyolországban. Megállapították, hogy a dialízis kezeléshez használt oldat alumínium tartalma ez idő alatt a HD központokban jelentősen csökkent, de 1996-ban még 20%-uk esetében nagyobb volt az ajánlott maximális 2 µg/L értéknél. Ezek közül az esetek 2,3%-ában az alumínium koncentráció kifejezetten nagy (>6 µg/L) volt. A megelőző intézkedések hatására a vizsgálat 8 évében 16,5%-ról 54,2%-ra nőtt azon betegek száma, akiknek a szérumban az alumínium koncentráció az elfogadható határérték alatt maradt (<20 µg/L). Megállapították továbbá, hogy a dializáló folyadékok Európában korábban biztonságosnak elfogadott 10 µg/L határértéke mára magasnak bizonyult, és helyette 2 µg/L határértéket javasoltak. A rendszeres ellenőrzés mellett is történhet véletlen alumínium mérgezés a dialízis kezelés során. Ilyen esetről számoltak be Hdez-Jaras és munkatársai 1988-ban [98]. A problémát az okozta, hogy a dialízis során használt infúziós oldat a hosszú tárolás alatt a palackból alumíniumot oldott ki, így koncentrációja a 10 µg/L alatti értékről 400 µg/L-re nőtt. Az infúzió hatására 8 dializált beteg esetében a szérumban alumínium szint elérte a 150 µg/L-t, mely érték lecsökkent a normális szintre, amint a problémát felismerték és az infúziós oldatokat kicserélték. Ugyanezen szerzők hívják fel a figyelmet arra is, hogy az alumínium bekerülhet a dializáló folyadékba nem megfelelő vízkezelés, hibás reverz ozmózis berendezés, ill. a víztisztítás során alumínium szerkezeti anyagok alkalmazása miatt is. Ezért alapvető fontosságú, hogy az alumínium koncentrációjának monitorozása ne korlátozódjon a HD kezelés alatt álló betegek rendszeres ellenőrzésére, hanem terjedjen ki az összes gyógyszerre, oldatra, ill. a víz tisztítására szolgáló berendezésre is [7]. Di Paolo és munkatársai HD kezelés alatt álló betegek szérumban és vizelet vizsgálatával megállapították, hogy mindkét minta tükrözi a HD betegek nagyobb alumínium koncentrációját, mivel nemcsak a szérumban, hanem a vizelet Al-szintje is nagyobb volt a kontroll értékeknél [99]. Rámutattak továbbá, hogy az urémiás betegek szervezetében különböző mértékben bár, de minden szövetben akkumulálódik az alumínium.

Az alumínium akkumuláció hatásának vizsgálatát nehezíti, hogy felvétele és beépülése más elemekkel kompetícióban valósul meg, és ezekről a folyamatokról kevés információ áll rendelkezésre. Olyan HD betegeknél például, ahol a

transzferrin vas szaturációja magasabb az átlagnál, az alumínium koncentrációja a vérben, ill. a szérumban alacsony marad, így kimutatása nehéz, felhalmozódik azonban más szövetekben, pl. a csontban, és toxikus hatását így is kifejti [100]. A szérum alumínium koncentrációjának hasonló csökkenését figyelték meg Parry és munkatársai [101] olyan betegeknél, akiknek a vérében a szilícium koncentrációja a szokásosnál nagyobb. Mivel azonban a szerzők nem vizsgálták más szövetek alumínium koncentrációjának alakulását a szilícium koncentráció függvényében, ezért nem tudták megállapítani, hogy a szilícium csak a szérum alumínium tartalmát csökkenti, vagy annak felszívódását és toxicitását is befolyásolja.

Fentiek alapján látható, hogy a rendszeres dialízis kezelés alatt álló betegek nyomelem státuszának vizsgálata orvosi és analitikai szempontból is számos problémát vet fel. A betegek nyomelem státuszának rendszeres vizsgálata megfelelő analitikai eljárás kifejlesztését és jól megszervezett alkalmazását teszi szükségessé. A nyomelem koncentrációk meghatározásának megoldásán túl szükség van azonban a dialízis kezeléseknél a nyomelem státuszra gyakorolt hatások alaposabb vizsgálatára, valamint a különböző nyomelemek koncentrációja és a biokémiai folyamatok (enzimaktivitás, vitaminok hatása, stb.) kapcsolatának, valamint a kórtörténetnek a tanulmányozására is, mivel ezekről nem áll rendelkezésre elegendő információ.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A nyomelem analitikának a klinikai gyakorlatban betöltött jelenlegi szerepét és a korábbi alkalmazásokat figyelembe véve az értekezés elkészítése során céljaim a következők voltak:

- Megfelelő mintavételi és -előkészítési módszerek kidolgozása kis mennyiségű minták nagy sorozatban végezhető előkészítésére, különös tekintettel a mintavétel, -tárolás és -előkészítés során bekövetkező kontamináció elkerülésére.
- A mintaelőkészítési módszerek közül a napjainkban legelfogadottabbnak és legmodernebbnek tartott mikrohullámú roncsolási módszer továbbfejlesztése és alkalmassá tétele igen kis mintamennyiségek (néhány mg) roncsolására megfelelő saveleggyel.
- Többféle rendelkezésre álló humánbiológiai minta vizsgálatával el kell dönteni, hogy a nyomelemstátusz mennyiségi vizsgálatára mely minták és analitikai kémiai módszer(-ek) a legalkalmasabb(-ak). Összehasonlító vizsgálatokat kell végezni ugyanazon személyektől származó haj, vér (plazma, szérum) mintákkal, egészséges kontroll személyek és HD betegek esetében.
- Nagyérzékenységű, lehetőleg multielemes szimultán analitikai módszer kidolgozása a kis mennyiségű minták analitikai vizsgálatára.
- Az egészséges kontrollokra és a hemodialízis kezelésben részesülő betegekre regionális referencia tartományok megállapítása a rendelkezésre álló irodalmi adatok és saját kísérletek eredményei alapján, az eredmények diagnosztikai alkalmazása céljából.
- Rendszeres hemodialízis kezelésben részesülő betegek vizsgálatával bizonyítani a módszer alkalmazhatóságát, vizsgálni a betegek nyomelem státuszának alakulását a dialízis kezelés során, felderíteni az esetleges nyomelem hiányt, toxikus elem felhalmozódást, ill. ezek lehetséges forrásait és összefüggését a betegek kórtörténetével.
- Célul tűztem ki a HD kezelésben részesülő betegek rendszeres nyomelem státusz vizsgálatához az analitikai háttér kidolgozását, és megteremteni a megfelelő időközönként végzett elemzésekkel a betegek egyénre szabott nyomelem pótlásának lehetőségét.

## 4. A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT VEGYSZEREK, ESZKÖZÖK, MŰSZEREK

### 4.1. Felhasznált vegyszerek és minták

A minták mikrohullámú roncsolásához nagy tisztaságú salétromsavat (suprapur, 65 % (m/m), Merck, Darmstadt, Németország) és hidrogén-peroxidot (suprapur, 30 % (m/m), Merck, Darmstadt, Németország) alkalmaztam. Abban az esetben, ha a minták szilikátot is tartalmaztak, a teljes roncsolás érdekében a roncsoló savelegyhez hidrogén-fluoridot adtam (suprapur, 40 % (m/m), Merck, Darmstadt, Németország).

A kísérletek során a minták jelre töltésére és hígítására, ill. a különféle oldatok elkészítéséhez nagy tisztaságú ioncserélt vizet használtam, melynek előállítása Milli-Q-Plus ioncserélő berendezéssel (APS Water Services Inc., USA) történt.

A hajminták mosási módszereinek kidolgozása során acetont és dietil-étert 1:3 arányú elegyét analitikai tisztaságú acetontól (Reanal) és dietil-étertől (Reanal) készítettem el. Az 1 %-os ionmentes detergens oldatot Decon-90 koncentrátumból ionmentes vízzel hígítottam.

A vér- szérum- és plazmaminták alternatív előkészítése trimetil-amin vizes oldatával történt (semiconductor grade, 25 % (m/m), Tamapure-AA, Tama Co. Ltd., Japán).

A hajminták mikro-PIXE módszerrel végzett vizsgálataikhoz a mintákat araldit gyantába öntöttem (Eporapid), illetve a hossz menti vizsgálatokhoz cianoakrilát ragasztóval rögzítettem a mintatartóhoz (Heurel KGaA, Düsseldorf, Németország).

A vérminták GFAAS mérése során habzágátlóként Szilorol-M, Szilorhab-OR, Szilorhab-9, Caola Antischaum, DOW DB-110/A, DOW DB 100, Silkolapse 5000, ICI Silicone EP6590, Tenzidef 2014, Tensiofix LO-51, Silkolapse 5020 és Entschäumer SF ionmentes vízzel készített, ~1 %-os oldatát, ill. szuszpenzióját használtam. A fenti anyagok közül a nehezen oldódóak esetében megvártam, míg a telített oldatból a szilárd anyag kiülepszik, s a kísérletekhez az oldat tisztáját használtam. Mátrixmódosítóként 0,2 %-os  $Mg(NO_3)_2$  oldatot használtam, melyet analitikai tisztaságú kristályos magnézium nitráttól ( $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , Reanal) készítettem. A mátrixmódosító oldathoz 0,05 % Triton-X100-at (analitikai

minőség, SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Németország) is adtam a minták fehérjetartalmának kicsapódása ellen.

A minták analitikai vizsgálata során a mono- és multielemes kalibráló oldatok, valamint a standard addíciós oldatsorozatok elkészítéséhez monoelemes spektrometriás standard oldatokat használtam (Merck, Fluka, Carlo-Erba, 1000 mg/L). A kalibráló oldatokat minden esetben 2 %-os salétromsavban készítettem el. Azokat az oldatokat, melyeknek koncentrációja 1 mg/L-nél kisebb volt, naponta frissen készítettem.

A vizsgálatokhoz szükséges, egészséges személyektől és rendszeres HD kezelés alatt álló betegektől származó haj- illetve vérminták gyűjtése a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügytudományi Centrum (DE OEC) I. sz. Belgyógyászati Klinika Műveseállomásán történt. A hajmintákat szobahőmérsékleten, polietilén tasakokban lezárva tároltuk, megjelölve minden esetben a hajszálok proximális (fejbőrhöz közeli) végét. A vérminták tárolása a vérvételhez használt Vacutainer csövekben történt  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, a szérum, ill. plazma mintákat  $1,5\text{ cm}^3$ -es Eppendorf csövekben tároltuk lefagyasztva az analízis kezdetéig.

A mintaelőkészítési módszerek fejlesztése és ellenőrzése során a következő referencia mintákat (CRM, certified reference material) használtam:

- NIST SRM 1577b Bovine Liver
- CTA-OTL-1 Oriental Tobacco Leaves
- NCS DC 73347 Human Hair.

A Műveseállomás víztisztító berendezésének vizsgálata során a berendezés különböző pontjairól, a dialízishez használt víz tisztításának egyes lépései után 1-1 liter vízmintát vettem, előzetesen 0,1 M  $\text{HNO}_3$ -val áztatott polietilén flakonokba, majd a mintákat  $10\text{ cm}^3$  65%-os  $\text{HNO}_3$  hozzáadásával megsavanyítottam, és az analízis megkezdéséig hűtőszekrényben tároltam. A víztisztító berendezés fém részeiből vett kis mennyiségű reszelék mintákat, ill. a víztisztítás során használt segédanyagokból vett mintákat (aktív szén, stb.) műanyag edényben tároltam.

### 4.2. Alkalmazott eszközök és berendezések

A hajminták mintavételére kezdetben rozsdamentes acélból készült ollót (Medicor, Debrecen), majd amikor ennek szennyező hatását kimutattam, saját fejlesztésű tantálcikarbid élű ollót illetve volframkarbid pengéjű kést használtam (lásd részletesebben az 5.1.1. fejezetben).

Vérminták mintavétele az I. sz. Belgyógyászati Klinika napi rutinjában is használt Vacutainer rendszerrel történt (Beckton-Dickinson, USA). Ennek legfontosabb eleme egy olyan zárt, 7 cm<sup>3</sup>-es üveg vagy műanyag kémcső, melyben vákuum van. A vénába vezetett vérvételi kanült a kémcsőre csatlakoztatva a csőben lévő vákuum hatására a vér gyorsan a csőbe áramlik, és a minta nem érintkezik levegővel, illetve egyéb szennyező forrásokkal. Vizsgálataim céljára a sötétkék kupakkal jelölt 7 cm<sup>3</sup> térfogatú, nátrium-heparin alvadásgátlót is tartalmazó Vacutainer csöveket használtam, melyek belső falát speciális bevonattal tették alkalmassá nyomelem analitikai célra vett vérminta tárolására.

A minták roncsolása során az összehasonlító vizsgálatokat saját készítésű fűthető, 20-140 °C-ig szabályozható hőmérsékletű blokkroncsolóban, maximálisan 1000 °C-ig elektromosan fűthető kemencében (Elekthermax, Pápa), illetve zárt rendszerű teflonbombás mikrohullámú roncsoló készülékekben (Milestone MLS 1200 Mega, Microwave Laboratory Systems, Olaszország, és CEM MARS-5, CEM Microwave Technology Ltd., USA) végeztem. A sorozatban végzett mintaroncsolások mikrohullámú készülékekben történtek a roncsolási program módosítása után, saját fejlesztésű kvarckémcsövekben valamint teflonbetétekben (Savillex Co. Ltd., USA).

A hajminták hossz és keresztmetszet menti nyomelemeloszlásának tanulmányozására és az alkalmazott mosási eljárás nyomelem koncentrációkra gyakorolt hatásának vizsgálatára mikro-PIXE módszert használtam. A mérések Scanning Nuclear Microprobe típusú, Oxford Microbeams gyártmányú készüléken történtek a debreceni Atommagkutató Intézetben.

A haj- és vérminták nyomelem koncentrációjának meghatározására Spectroflame típusú ICP-OES készülékkel (Spectro GmbH, Németország) (beállításokat lásd: 1. táblázat), Elan-6000 típusú ICP-QMS készülékkel (Perkin-Elmer Sciex, Ontario,

#### 4. A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT VEGYSZEREK, ESZKÖZÖK, MŰSZEREK

Kanada) (2. táblázat), és GTA-96-os grafitküvetés egységgel felszerelt Varian SpectrAA-10 típusú atomabszorpciós spektrométerrel (beállításokat lásd: 3. táblázat) történtek.

|                                    |                          |
|------------------------------------|--------------------------|
| Műszer típusa                      | SPECTROFLAME ICP-AES     |
| Frekvencia                         | 27,1MHz                  |
| Porlasztó                          | Meinhardt-típusú         |
| Ködkamra                           | SCOTT-típusú             |
| Plazmagáz                          | Ar, 1,5 liter/perc       |
| Hűtőgáz                            | Ar, 15 liter/perc        |
| Porlasztó gáz                      | Ar, 1 liter/perc         |
| Mintabevitel                       | 1 cm <sup>3</sup> /perc  |
| Integrációs idő a detektálás során | 25másodperc a vonalon,   |
| Szoftver                           | SPECTRO EPC3 for Windows |

1. táblázat: az alkalmazott ICP-OES készülék beállítási adatai

|                        |                              |
|------------------------|------------------------------|
| Készülék               | Perkin-Elmer Sciex ELAN-6000 |
| RF tejesítmény         | 1300 W                       |
| Hűtő argonáram         | 14 L/min.                    |
| Közbelső argonáram     | 1.2 L/min                    |
| Porlasztó argonáram    | 0.93 L/min                   |
| Mintabeviteli sebesség | 0.087 cm <sup>3</sup> /min   |
| Porlasztó              | Micromist                    |
| Ködkamra               | Minicyclonic                 |
| Sampler                | Nikkel, 1.1 mm nyílású       |
| Skimmer                | Nikkel, 0.9 mm nyílású       |
| Felbontás (m/Δm)       | 300                          |
| Szkennelési mód        | Peak hopping                 |
| Dwell time/amu         | 200                          |
| Szkennelés/ismétlés    | 10                           |
| Ismétlések             | 3                            |

2. táblázat: az alkalmazott ICP-MS készülék beállítási adatai

A DE OEC Műveseállomásáról származó szilárd minták minőségi és tájékoztató mennyiségi elemzése (elsősorban fémnyomok áttekintő elemzése céljából) Zeiss Q-

#### 4. A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT VEGYSZEREK, ESZKÖZÖK, MŰSZEREK

---

24 típusú spektrográffal történt, a színképlemezeket Zeiss SP-2-es színképvetítő segítségével értékeltem.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Készülék                 | Varian SpektrAA-10 + GTA-96  |
| Hullámhossz              | 309,0 nm   |
| Lámpaáram                | 12 mA  |
| Erősítés                 | 298.3 V  |
| Rés                      | 0,5 nm   |
| Injektált mintamennyiség | 20 µL  |
| Fűtési program           | szárítás 85 °C 40 s, 95 °C 10 s, 120 °C 5 s<br>hamvasztás 1200 °C 5 s<br>atomizálás 2600 °C 3 s<br>tisztítás 2700 °C 1 s |

3. táblázat: az alumínium mérésére használt GFAAS készülék beállítási adatai

A vizsgálatok során a haj- és vérminták, valamint a felhasznált vegyszerek, oldatok tárolása, kezelése és előkészítése az eszközökből kioldódó szennyeződések lehetőségének minimálisra csökkentése érdekében nagy tisztaságú, műanyagból készült laboratóriumi eszközökkel(-ben) történt.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1. Mintavételi és –előkészítési módszerek kidolgozása

#### 5.1.1. Hajminták

A haj növekedése során folyamatosan ki van téve a környezetből, kozmetikumokból és egyéb forrásokból származó szennyeződéseknek. További szennyező forrást jelentenek azok a laboratóriumi műveletek is, melyek a mintavétel és -előkészítés során kerülnek alkalmazásra. Munkám első részében ezért a hajmintával kapcsolatos mintavételi és mintaelőkészítési problémákkal foglalkoztam. Célom volt, hogy olyan mintaelőkészítési protokollt dolgozzak ki, mely minimális kontaminációval jár, és hatékonyan távolítja el az exogén felületi szennyeződések. A hajminták nagy szervesanyag tartalma miatt a megfelelő roncsolási módszer alkalmazása sem kerülhető el. A rendelkezésre álló módszereket alapul véve itt olyan új megoldásokat alkalmaztam, melyek segítségével az analízishez szükséges minta mennyisége nagymértékben csökkenthető a minták további szennyeződése és az eredmények megbízhatóságának csökkenése nélkül. A kidolgozott módszerek alkalmazhatóságát referencia minták segítségével bizonyítottam.

##### 5.1.1.1. A mintavétel eszközei

Hajminták esetében a mintavétel során az alkalmazott eszköz (olló, kés, szike, stb.) komoly forrása lehet a minták szennyeződésének.

Ennek elkerülésére az irodalomban különböző eszközöket javasolnak mintavételre, pl. titán-nitrid vagy teflon bevonatú, esetleg kvarcból készült szikét. Ezek bár nem szennyeznek a hajmintákat nyomelemekkel, de nehezen hozzáférhetőek és sérülékenyek. Ezért a mintavétel céljára két eszközt terveztem és készítettem el: (1) tantál-karbid vágóélű ollót és (2) wolfram-karbid pengéjű szikét (1. ábra). A tantál-karbid vágóélű olló rozsdamentes acél olló módosításával készült, a vágóéleket és a súrlódó felületeket karbidizált felületű, nagy tisztaságú tantál

lemezzel borítottuk be. A általunk készített szikének acél nyélbe forrasztott, kovácsolt wolfram-karbid pengéje van. Ezen eszközök csak tantállal, ill. wolframmal szennyezik a mintákat, mely elemeket a hajmintákból nem mértem.

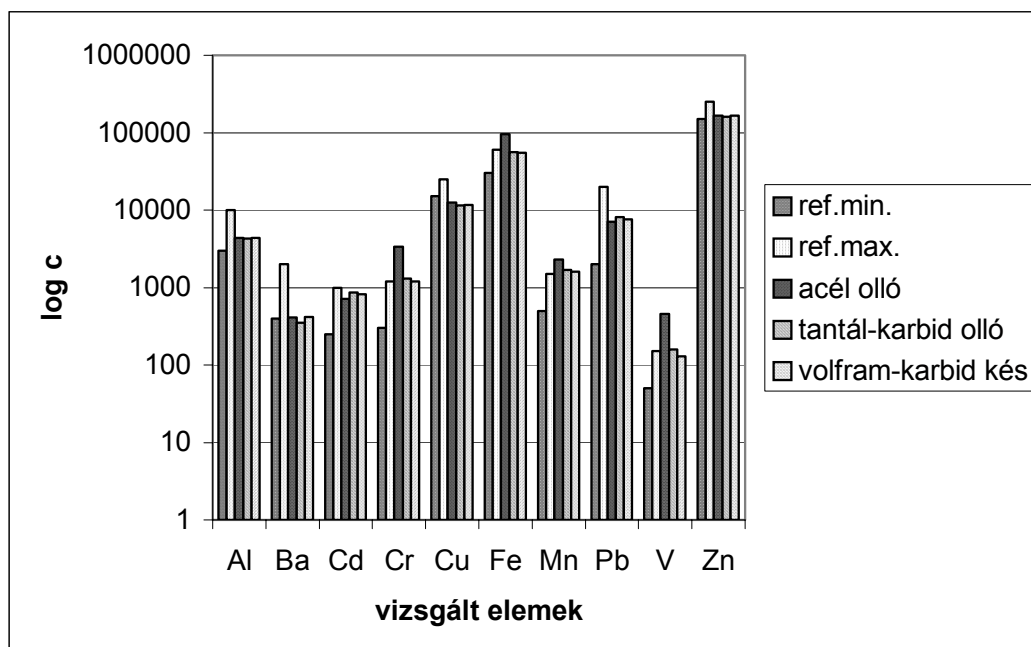


1. ábra: A mintavétel eszközei:  
tantál-karbid élű olló és wolfram-karbid pengéjű szike

Az elkészített eszközök esetében vizsgáltam, hogy a haj mintavétele, ill. a minta roncsolás előtt szükséges aprítása során szennyezik-e a meghatározni kívánt elemekkel a hajmintákat. Ennek során kis (~3-5 g) hajminta részleteket aprítottam kb. 0,5 cm-es darabokra a fenti két eszközzel, illetve rozsdamentes acél ollóval. A felaprított mintákat ezután mikrohullámú készülékben elroncsoltam és az elemkoncentrációkat ICP-OES és GFAAS módszerekkel meghatároztam. A különböző eszközökkel aprított hajmintákra kapott eredmények a 2. ábrán láthatók. A koncentrációk  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ban értendők (a logaritmus skála alkalmazását az egyes elemek koncentrációjának nagyságrendi eltérései tették szükségessé). Az ábrán minden elem esetében feltüntettem a WHO 1996-os ajánlásában szereplő, hajra vonatkozó minimum (ref.min.) és maximum (ref.max.) értékeket is. Látható, hogy a WHO által megadott koncentráció tartományok és a vizsgált hajminta nyomelem összetétele igen hasonló. Kiemelkedően nagy volt azonban a Cr, Fe, Mn és V koncentrációja abban a mintában, melyet rozsdamentes acél ollóval aprítottam össze. A többi elem koncentrációja a három mintában közel azonos volt. A tantál-karbid élű ollót és a wolfram-karbid pengéjű szikét összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy bár az eredmények igen hasonlóak, a Cd, Cr, Fe, Mn és Pb

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

tekintetében a wolfram-karbid szikével aprított minták koncentrációja kisebb volt. Mivel a hajminták ugyanazon személytől származtak és az előkészítés valamint a mérés ugyanúgy történt minden minta esetében, ezért a tapasztalt jelentős különbségek oka csak a vágóeszközök anyagának különbözősége lehetett.



2. ábra: a vágóeszközök tesztjének eredményei (a függőleges tengelyen a  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ban mért koncentráció logaritmus szerepel)

A mintavételi eszközök alkalmazása során kiderült, hogy a tantál-karbid élű olló hosszú távon nem használható megbízhatóan, mivel a vágóél vékony karbidizált rétegét az élek egymáson való súrlódása hamar elkoptatja, és a visszamaradó tantál felület meglehetősen puha, vágásra alkalmatlan. Ezért a haj mintavételéhez és előkészítéséhez a vizsgálatok során a wolfram-karbid pengéjű szikét használtam.

### 5.1.1.2. Mosási módszerek kidolgozása és vizsgálata

A hajanalízissel kapcsolatban az egyik alapvető és gyakran vitatott kérdés a hajminta tisztítása, mosása, az előkészítés során. Az irodalomban található módszerek két szélsőség között változnak; a csak desztillált vízzel történő mosástól a szerves oldószer elegyek és ionmentes detergenst alkalmazó mosási módszerekig igen sok variáció létezik.

Az irodalmi adatok alapján kísérleteket végeztem annak megállapítására, hogy a kiválasztott mosási módszerek alkalmazása hogyan befolyásolja a hajminták nyomelem koncentrációját és az eredmények szórását. Kísérleteim során az általam készített átlaghajminta egy-egy részletét készítettem elő az alábbi kombinált mosási műveletek egyikével:

1. Mosás szerves oldószer eleggyel, majd kétszer desztillált vízzel
2. Mosás ionmentes detergenssel, majd kétszer desztillált vízzel
3. Mosás szerves oldószer eleggyel, ionmentes detergenssel, majd kétszer desztillált vízzel
4. Mosás ionmentes detergenssel, szerves oldószer eleggyel, majd kétszer desztillált vízzel

A különféle mosási módszereket úgy hasonlítottam össze, hogy a mosási módszerekkel kezelt hajmintákat elroncsoltam, és meghatároztam a mintákban az elemek koncentrációját. A szerves oldószer elegy minden esetben aceton: dietiléter=1:3 arányú elegy volt, az ionmentes detergens pedig kétszer desztillált vízzel készült 1 %-os Decon-90 oldat. Az egyes oldatokból mindig annyit alkalmaztam, hogy a hajmintát elfedje, és rövid keverés után leöntöttem a mintáról. Minden oldószerrel háromszor ismételt meg a mosási műveletet, friss oldószert használva minden esetben. Ezután a mintákat szárítószekrényben 105°C-on tömegállandóságig szárítottam. Az így előkészített mintákból ~0,5 g-os ( $\pm 0.1$  mg) részleteket mértem teflonbombákba (minden mintából 5 párhuzamos mérés készült), 0,25 cm<sup>3</sup> 30 %-os hidrogén-peroxidot és 3,00 cm<sup>3</sup> 65 %-os salétromsavat adtam hozzá, majd mikrohullámú készülékben végeztem el a roncsolást. A mintákat maradéktalanul műanyag kémcsövekbe vittem át, 10,00 cm<sup>3</sup>-re töltöttem

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

0,1 mol/dm<sup>3</sup> salétromsavval, és ICP-AES készülékkel határoztam meg a nyomelem összetételt.

A bárium, a vas, magnézium és cink esetében azt tapasztaltam, hogy a szerves oldószer elegyet és ionmentes detergenst is alkalmazó mosási módszer esetén a kapott koncentrációk kisebbek voltak, mint amikor csak az egyik illetve másik anyagot alkalmaztam a mosás során.

| nyomelem | mosással nem kezelt haj nyomelem-koncentrációja, µg/g-ban | A hajminták elemkoncentrációja µg/g-ban |                                     |   |   | a 3. módszerrel mosott hajban visszamaradt nyomelemek aránya a mosással nem kezelt hajmintákhoz képest, % |
|----------|---|---|-------------------------------------|---|---|---|
|          |   | 1. szerves oldószeranyag                | 2. ionmentes detergens vizes oldata | 3. szerves oldószeranyag + ionmentes detergens vizes oldata | 4. ionmentes detergens vizes oldata + szerves oldószeranyag |   |
| B        | 1,55±0,08   | 1,14±0,71                               | 1,95±0,92                           | 1,06±0,21   | 1,01±0,16   | 58,06   |
| Ba       | 1,06±0,05   | 2,21±0,25                               | 3,13±0,42                           | 3,16±0,36   | 3,28±0,29   | 25,47   |
| Ca       | 1385±105  | 621±32                                  | 644±21                              | 598±39  | 619±28  | 44,03   |
| Cu       | 12,37±0,38  | 11,36±0,61                              | 11,56±0,38                          | 11,86±0,24  | 11,85±0,69  | 95,91   |
| Fe       | 26,47±6,51  | 28,28±7,14                              | 22,66±14,9                          | 17,01±4,7   | 20,20±5,93  | 64,24   |
| Mg       | 247±26  | 125±10                                  | 103±30                              | 106±20  | 104±20  | 42,89   |
| Mn       | 2,34±0,18   | 0,85±0,15                               | 1,13±0,043                          | 1,02±0,10   | 0,87±0,10   | 43,90   |
| Zn       | 168±12  | 179±10                                  | 188±9                               | 164±8   | 170±7   | 97,81   |
| Pb       | 19,76±2,78  | 5,25±1,06                               | 5,12±0,91                           | 5,04±0,99   | 5,45±1,19   | 25,51   |

4. táblázat: A hajminták mosási kísérleteinek eredményei

A többi kiválasztott elem esetében nem tapasztaltam jelentős különbséget a mért koncentrációk között különböző mosási módszerek alkalmazása esetén. Ez valószínűleg azt jelenti, hogy az adott elem hasonló hatékonysággal távolítható el az alkalmazott mosási módszerekkel. Az 4. táblázat adataiból látható, hogy az összehasonlított mosási módszerek között jelentős különbség lehet abban, hogy milyen határfokkal távolítják el az exogén szennyeződések a hajmintákról. A kísérleti adatok alapján, figyelembe véve a rendelkezésre álló irodalmi adatokat és ajánlásokat is [10,13-17], a kísérleti részben 3-as sorszámmal szereplő módszert választottam a további vizsgálatokhoz. Ez a módszer szerves oldószer eleggyel,

ionmentes detergens oldattal, majd kétszer desztillált vízzel való mosást tartalmaz. Látható, hogy a módszer csak a műveletek sorrendjében különbözik a 4-es számútól, és előnye azzal szemben, hogy a szerves oldószer elegyet a művelet elején kell alkalmazni, így annak nyomai (melyek a szárítószekrényben való szárítás során esetleg lánggra lobbanhatnak illetve egészségre károsak) az ionmentes detergenssel és a kétszer desztillált vízzel történt mosás során teljesen eltávolíthatók. Megvizsgáltam azt is, hogy a kiválasztott mosási módszerrel kezelt hajmintákban a nyomelemek hány %-a marad meg a mosás után a nem kezelt hajhoz képest. Látható, hogy az elemek többségénél, a réz és cink kivételével, a mosási művelet során igen jelentős mennyiség távozik a mintából. Ez talán azzal magyarázható, hogy az említett két elem kivételével nagy mennyiségű anyag származik exogén forrásból, vagy az említett két elem exogén nyomai olyan erősen kötődnek a hajhoz, hogy azok nem távolíthatók el az alkalmazott mosási műveletekkel (e feltételezés azonban még további kísérleti bizonyítást igényel). Az ólom, bárium, kalcium, magnézium és mangán esetében a teljes mennyiség több, mint felét (az ólom és bárium esetében 75%-át) távolítja el az alkalmazott mosási művelet. A vas és bór esetében ez a mennyiség kisebb. A nagy különbségek oka az, hogy egyrészt az elemek egy része a felületről könnyen eltávolítható szállóporban található, másrészt az elemek a hajszál különböző rétegeiben, más-más kötés- és vegyületformákban vannak jelen, ezért a mosási módszerek különböző hatékonysággal távolítják el azokat.

Az, hogy a hajban ténylegesen jelenlévő endogén eredetű nyomelemek mennyiségét csökkenti-e kis mértékben az alkalmazott mosási művelet vagy sem, e kísérleteknél nem határoztam meg. A mosási műveletek ilyen jellegű vizsgálatára irodalmi adatok sem állnak rendelkezésre. A fentiekben szereplő eredményekből látható, hogy bár a kiválasztott mosási módszert összehasonlítottam három irodalmi eljárással, megfelelő analitikai eljárás hiányában annak tényleges hatékonyságát nem állt módomban vizsgálni. Annak igazolására, hogy az egyes elemek eltérő eloszlásban és rétegben akumulálódnak a hajszálban, mikro-PIXE módszerrel végeztünk méréseket a Magyar Tudományos Akadémia Atommagkutató Intézetében, Debrecenben.

### 5.1.1.3. Hajminták nyomelem eloszlásának vizsgálata mikro-PIXE módszerrel

A hajminták esetében különösen fontos, hogy az elemek milyen erősen kötődnek a hajsza anyagához, és az, hogy a hajsza mely részében helyezkednek el, ill. dúsulnak fel. A különböző helyen és módon kötött elemek esetében ugyanis különböző lehet az előkészítés során alkalmazott mosási módszerek hatékonysága, és különböző módon befolyásolható az endogén nyomelem összetétel is. A mosási kísérletek során korábban bemutattam, hogy a vizsgált elemek koncentrációját az alkalmazott kombinált tisztítási módszer eltérő mértékben befolyásolta a hajban (lásd 5.1.1.2. fejezet, 4. táblázat). Ennek oka lehet a nagymértékben különböző exogén szennyeződés, de az is, hogy az elemek egy része erősebben, más része gyengébben kötődik a haj anyagához, és ezért nehezebben, ill. könnyebben távolítható el.

Az eredmények összehasonlíthatósága miatt fontos kérdés az is, hogy az általam vizsgált hemodialízis kezelés alatt álló betegek és a kontrollok esetében az elemek azonos módon oszlanak-e meg a hajsza belsejében vagy sem.

Ezért néhány elem esetében vizsgáltam, hogy azok hogyan oszlanak el a hajsza hossza, ill. keresztmetszete mentén, milyen hatást gyakorol a mosási művelet ezen elemek hossz- és keresztmetszet menti koncentrációjára, és azt is, hogy van-e különbség a kontrollok és a HD betegek hajmintáinak nyomelem koncentrációjában, ill. eloszlásában. A vizsgált elemeket elsősorban a PIXE módszer korlátainak figyelembe vételével választottam ki.

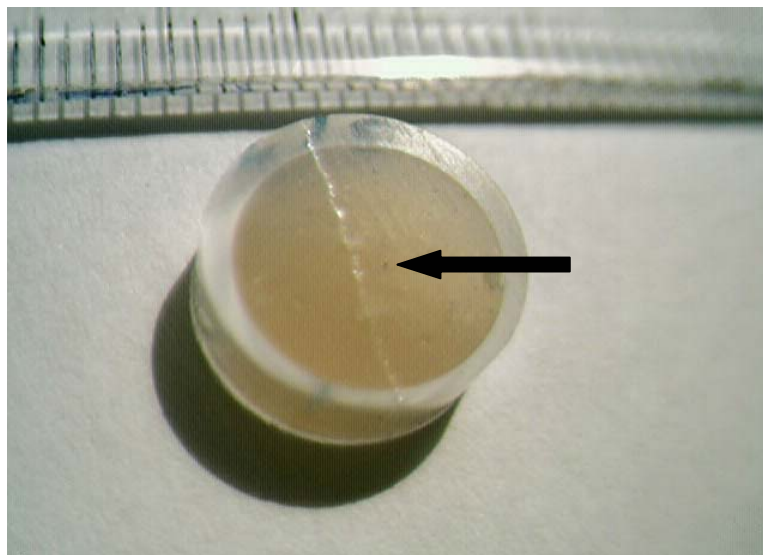
|                        |   |
|------------------------|---|
| Készülék               | Scanning Nuclear Microprobe, Oxford Microbeams Ltd. |
| Protonnyaláb energiája | 2 MeV   |
| Áramerősség            | ~ 50 pA   |
| Összegyűjtött töltés   | ~ 0.2 $\mu$ C                                       |
| Integrációs idő        | 60 perc   |
| Protonnyaláb átmérője  | ~ 2 $\times$ 2 $\mu$ m                              |

5. táblázat: az alkalmazott mikro-PIXE készülék fontosabb adatai (~: közelítő értékek)

A vizsgálatokhoz mikro-PIXE módszert alkalmaztam, mely képes igen nagy felbontásban közvetlenül vizsgálni a szilárd mintát. A készülék legfontosabb beállítási adatai a 5. táblázatban láthatók. A mérések során a Zn, K, Ca, Fe és Cl koncentrációját és eloszlását határoztam meg egészséges kontroll személyektől (átlag életkor  $47\pm 1$  év,  $n=3$ ) és HD betegektől (átlag életkor  $57\pm 1$  év,  $n=3$ ) származó hajminták esetében.

A vizsgálathoz szükséges néhány hajszál eltávolítása mindenkinél a tarkóról történt, a fejbőrből kihúzva azokat lehetőleg a hajhagymával együtt (ez később megkönnyítette a hajszál fejbőrhöz közeli végének azonosítását). A hajszálak vizsgálata az 5.1.1. fejezetben részletezett módon tisztítva, illetve tisztítás nélkül is megtörtént.

Az elemek keresztmetszeti eloszlásának vizsgálatához az egyes hajszálakat 10 mm belső átmérőjű, 5 cm hosszúságú polisztirol csövek belsejében, azok hossz tengelye mentén kifeszítettem, és araldit műgyantával kiöntve rögzítettem. A gyanta megszilárdulása után a mintából a hajszál proximális (fejbőrhöz közeli) végétől kezdve 5 mm-enként szeleteket vágtam le, és e metszetek felületét a vizsgálat előtt políroztam, nagy tisztaságú ioncserélt vízzel leöblítettem, majd szobahőmérsékleten megszáritottam. Egy ilyen előkészített metszet látható a 3. ábrán, a hajszál helyét a gyantában nyíl jelöli.



3. ábra: gyantába ágyazott hajminta a mikro-PIXE vizsgálatokhoz

A hossz menti vizsgálatokhoz a hajszálakat alumínium keretre feszítettem ki a 4. ábrán látható módon, egymástól 3 mm távolságra, a végüket cianoakrilát ragasztóval rögzítettem a kerethez. A szórt Röntgen-sugárzás detektálásának megakadályozására a keret mögé 3 mm vastagságú, nagy tisztaságú Teflon lapot rögzítettünk. A hajszálak keretbe foglalt 25 mm-es darabjainak vizsgálatát 2,5 mm-es szakaszokon végeztük, az ezen szakaszokról származó jelet integráltuk, és így minden hajszál minta esetében az adott szegmensekre jellemző átlagkoncentrációkat határoztuk meg.



4. ábra: hajszálak rögzítése az alumínium kerethez hosszmenti vizsgálatokhoz

A mérések során a karakterisztikus Röntgen-színképeket a PIXYKLM programmal értékeltük ki, a koncentrációk számítása során a hajmintákban nagy mennyiségben jelen lévő kénként használtuk belső standardként.

A mikro-PIXE módszer ellenőrzésére referencia hajmintát (NCS DC 73347 Human Hair) használtunk, melyből a vizsgálathoz 1 cm átmérőjű, 2 mm vastagságú tablettát préseltünk. A kapott eredmények, a referencia értékek és a roncsolt minta oldatából ICP-OES módszerrel meghatározott koncentrációk a 6. táblázatban láthatók. A Ca, K és Zn esetében az ICP-OES módszerrel kapott eredmények jobb

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

egyezést mutatnak a szavatolt koncentrációkkal, míg a vas mennyiségét a mintában ICP-OES módszerrel jelentősen alá, mikro-PIXE módszerrel jelentősen fölé mértem. A minta klórtartalmára sem szavatolt koncentráció, sem direkt ICP-OES módszerrel meghatározott eredmény nem állt rendelkezésre. A mikro-PIXE módszerrel kapott gyengébb visszanyerések a kalibráció nehézségének és pontatlanságának tulajdoníthatók.

| elem | koncentráció ( $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ ) |          |          |
|------|--|----------|----------|
|      | szavatolt                                      | ICP-OES  | PIXE     |
| Ca   | 2900±200                                       | 2768±110 | 3700±200 |
| Cl   | --   | --       | 100±40   |
| Fe   | 54±6   | 43±7     | 65±5     |
| K    | 20*  | 19±2     | 17±5     |
| Zn   | 190±5  | 195±8    | 210±15   |

\* nem szavatolt érték

6. táblázat: a vizsgált elemek koncentrációi a referencia hajmintából

Mivel a mosási művelet elsősorban a hajsza külső rétegében befolyásolja az elemkoncentrációkat, ezért meghatároztam a felületi nyomelem koncentrációkat a nem mosott és a mosott hajminták esetében. Ennek eredményei láthatók a 7. táblázatban.

| elem | koncentráció ( $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ ) |            |
|------|--|------------|
|      | mosás előtt                                    | mosás után |
| Ca   | 408±150  | 384±112    |
| Cl   | 6107±1714                                      | 3470±1446  |
| Fe   | 32±20  | 31±22      |
| K    | 1164±846                                       | 497±552    |
| Zn   | 142±24   | 121±42     |

7. táblázat: a mosás hatása a hajsza felületi elemkoncentrációira

A várakozásnak megfelelően jelentős koncentráció csökkenést okozott a mosási művelet a kálium esetében, ami arra utal, hogy a kálium a haj szerkezetében csak

gyengén kötött, ezért könnyen eltávolítható. A Cl koncentrációja is nagymértékben csökkent a mosás hatására, annak ellenére, hogy eloszlása homogén volt a hajszálban. A Ca, Fe és Zn koncentrációja alig változott, ami erősebb kötődésükre, ill. kis mobilizálhatóságukra enged következtetni.

A hajszálak keresztmetszete mentén mért koncentrációt a hajhagymától mért távolság függvényében vizsgálva (8. táblázat) azt tapasztaltuk, hogy a Ca koncentrációja a proximális végtől távolodva csökken. A K és Cl esetében ezzel ellentétben növekedést figyeltem meg a fejbőrtől távolodva; mindkét elemnél a 2. szegmensben mértem a legmagasabb koncentrációkat. A vas koncentrációja az egyes szegmensekben erősen ingadozott, míg a cinké nem változott jelentősen a hajszál hossza mentén.

| elem | koncentráció ( $\mu\text{g/g}\pm\text{SD}$ ) különböző távolságokra ( $l$ ) a hajhagymától |                 |                 |
|------|--|-----------------|-----------------|
|      | $l=5\text{mm}$   | $l=10\text{mm}$ | $l=15\text{mm}$ |
| Ca   | 1130 $\pm$ 14  | 629 $\pm$ 7     | 713 $\pm$ 8     |
| Cl   | 1474 $\pm$ 72  | 3362 $\pm$ 40   | 2162 $\pm$ 49   |
| Fe   | 57 $\pm$ 11  | 6 $\pm$ 4       | 49 $\pm$ 6      |
| K    | 179 $\pm$ 9  | 420 $\pm$ 6     | 239 $\pm$ 6     |
| Zn   | 202 $\pm$ 30   | 175 $\pm$ 16    | 186 $\pm$ 20    |

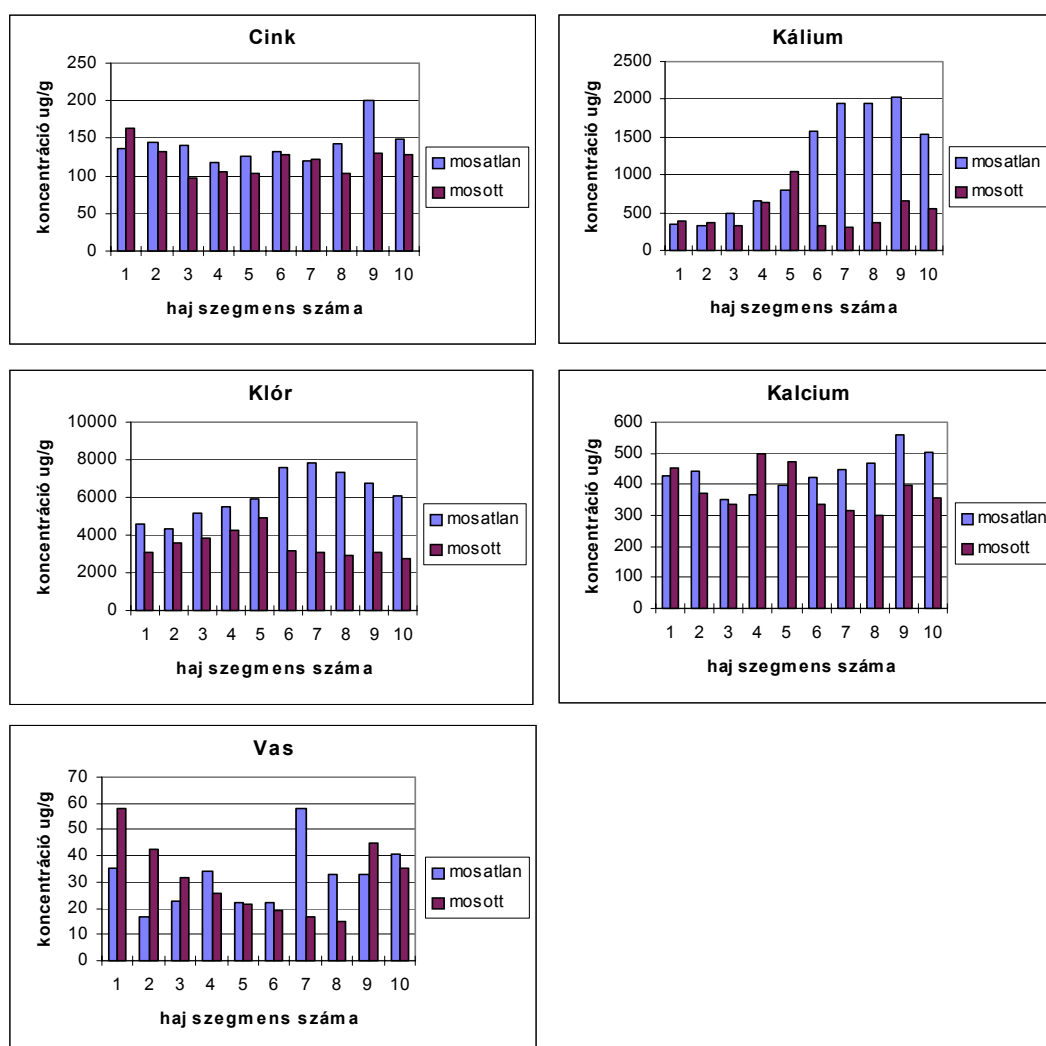
8. táblázat: a keresztmetszeti koncentrációk változása a hajhagymától mért távolság függvényében

A mosási műveletnek a haj felületi koncentrációra gyakorolt hatását megvizsgáltam a 25 mm-es hajszál 2,5 mm-es szegmenseiben is. A 5. ábrán látható diagramokon a mosott és nem mosott hajszál eredményeit tüntettem fel, a szegmensek sorszáma a fejbőrtől távolodva nő.

A cink koncentrációja a nem mosott hajszál felületén gyakorlatilag nem változott. A hajszál végén megfigyelhető kis mértékű növekedés lokális szennyeződésre utal. Ezt igazolja az, hogy a hajszál mosása után ez a maximum nagymértékben lecsökkent, és a koncentráció a többi szegmensben mért értékhez vált hasonlónvá. A mosással kezelt hajszál cink koncentrációja a nem mosott hajhoz képest kb. 15%-kal csökkent és kis mértékű ingadozást mutatott. A legnagyobb koncentrációt a fejbőrhöz közeli szegmensben mértem. Ez arra enged következtetni, hogy a hajszál

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

cink tartalma a környezeti hatások miatt a növekedés során kis mértékben csökken. Hasonló eredményeket kaptam a keresztmetszeti minták vizsgálatával is (lásd 8. táblázat).



5. ábra: az elemkoncentrációk változása a hajszál felületén a hossz függvényében, mosás előtt és után

A kálium és klór esetében a nem mosott hajminta felületén növekedést figyeltem meg a proximális végtől távolodva. Ez a növekedés mindkét elemnél hasonló volt, a koncentráció értékek azonban eltérően változtak. A klór esetében a minimum és a

maximum között kb. kétszeres különbséget tapasztaltam, míg a káliumnál ez a különbség négy-ötszörös volt. Ez a tendencia a külső réteg mosással történő eltávolításával megszűnt. Látható, hogy a kálium koncentrációja az első 5 szegmensben a mosás hatására alig változott, majd a 6-10 szegmensekben drasztikusan lecsökkent. Ennek oka az lehet, hogy az exogén eredetű kálium az eltelt idővel arányosan halmozódik fel a hajszál felületén és külső rétegében, illetve a haj szerkezete változhat meg idővel oly mértékben, hogy a kálium a mosási művelettel jobban eltávolítható. A káliumhoz hasonlóan változott a klór mennyisége is a szegmensekben, a proximális véghez közeli 5 szegmensben a mosás hatására bekövetkező változás kisebb, míg a disztális (a fejbőrtől távoli) szegmensekben a mosás hatására bekövetkező koncentráció csökkenés jelentős.

A kalcium mennyisége kis mértékben nőtt a hajszál felületén a fejbőrtől távolodva a mosással nem kezelt minta esetében, az exogén eredetű kalcium felületen történő akkumulációja miatt. A mosási művelet után a koncentráció fluktuált, de nem figyelhető meg tendenciózus változás a hajszál hossza mentén. A káliumhoz hasonlóan itt is a 4-5. szegmensekben figyeltem meg a legnagyobb koncentrációt.

A nem mosott hajminták vizsgálata során a vas koncentrációjának jelentős ingadozását figyeltem meg a hajszál felületén. A minta mosása után azonban a szegmensekben – a 9 és 10. kivételével – a vas koncentrációjának csökkenését tapasztaltam a proximális végtől távolodva. Ez a csökkenő tendencia annak a következménye, hogy a vas a külső rétegben dúsul fel a hajszál növekedése során. Mivel a vas túlnyomó része nem a vérből, hanem főleg a bőrhöz közeli mirigyek váladékából kerül be a hajba [42], nem épül be annak anyagába, és ezért a környezeti hatások a hajszál növekedése során egyre nagyobb mennyiséget mosnak ki az eredeti vastartalomból.

A kontroll személyek és a HD betegek hajmintáinak hosszmenti koncentráció tartományait és az irodalmi értékeket összehasonlítva (9. táblázat) azt tapasztaltam, hogy a Fe, Zn és Ca koncentrációk nagyságrendileg egyeznek a két csoport esetében, míg a Cl és K koncentrációja a HD betegek esetében nagyobb, mint a kontroll mintákban.

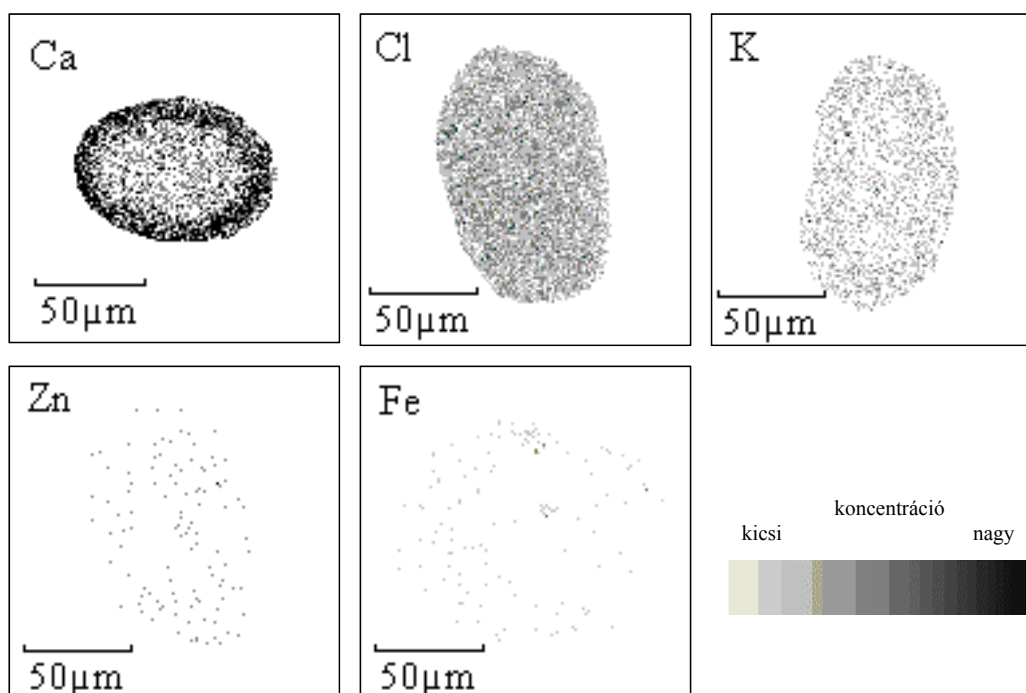
A referencia tartományhoz képest a betegek Zn és Ca koncentrációja – átlagát tekintve - kisebb, a Cl és K nagyobb volt, míg a vas koncentrációja közel azonosnak adódott. A klinikai gyakorlatban ismert, hogy a HD betegek szérumában

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

a K koncentrációja magasabb a normál értéknél, míg a Fe, Ca és Cl koncentrációja alacsonyabb. Hajmintákból e megfigyeléseket csak a Ca és K esetében sikerült igazolni, ami arra hívja fel a figyelmet, hogy a vér (szérum, plazma) és haj összetétele között nincs minden elemre szoros korreláció a vizsgált betegcsoportnál.

| elem | koncentráció tartományok ( $\mu\text{g/g}$ ) |                       |                       |
|------|--|-----------------------|-----------------------|
|      | <i>irodalom [89]</i>                         | <i>HD beteg (n=3)</i> | <i>kontroll (n=3)</i> |
| Ca   | 146-3190                                     | 298-559               | 135-1598              |
| Cl   | 950-4805                                     | 2746-7821             | 394-2382              |
| Fe   | 5-45   | 15-58                 | 6-51                  |
| K    | 150-663                                      | 327-2031              | 54-1055               |
| Zn   | 99-450                                       | 96-163                | 102-183               |

9. táblázat: hosszmenti eredmények összehasonlítása (mosással kezelt minták)



6. ábra: elemeloszlások a hajszál keresztmetszete mentén (HD beteg, mosással nem kezelt minták)

A vizsgált elemek keresztmetszeti eloszlásában nem tapasztaltam különbséget a kontrollok és a HD betegek között. Néhány kiválasztott keresztmetszeti eloszlás látható a 6. ábrán.

Az elemek közül az 1 órás integrálási idő alatt a Ca, K és Cl esetében sikerült jól értékelhető elemeloszlás térképeket meghatározni, a Zn és Fe koncentrációja ehhez túl kicsi volt. Látható, hogy a Cl eloszlása homogén a hajszál teljes keresztmetszetében. A kálium eloszlása is homogén, de a hajszál felszínéhez közel kis mértékű dúsulás figyelhető meg. Ez a felszíni dúsulás a tisztítás során kimosódáshoz vezethet. A kalcium eloszlása még markánsabb különbséget mutat a hajban: a felszínhez közeli külső rétegben dúsul fel, kisebb szigetek formájában. A kevésbé értékelhető eloszlás térképek alapján a Zn eloszlása a hajban közel homogén, míg a Fe a külső rétegben dúsul fel. Az eredmények alapján a vizsgált elemek közül ezért a káliumon kívül a kalcium és vas esetében is jelentősebb kimosódás volt várható.

A vizsgált elemek esetében jelentős eltéréseket tapasztaltam az eloszlásban mind a keresztmetszetek, mind pedig a hajszálak hossza mentén. Az elemek különböző eloszlása és a hajszál más rétegeiben való dúsulása jelentős hatással van arra, hogy milyen mértékben változik az endogén nyomelem összetétel a mosási művelet során. Ugyanakkor magyarázatot ad arra is, hogy miért vannak jelentős eltérések az egyes elemek mosás hatására bekövetkező koncentráció változásában. A kísérleti eredményeim azt mutatták, hogy az alkalmazott mikro-PIXE módszer kiválóan alkalmas a hajszálak felületi és keresztmetszeti nyomelem eloszlásának vizsgálatára. Bár a módszer drága és lassú, az általa szolgáltatott információk alapján a hajminták analízisére alkalmazott rutin analitikai módszerek könnyebben tervezhetők.

#### 5.1.1.4. Mikrohullámú roncsolási módszer fejlesztése

A minták mosása után az előkészítés következő lépése a roncsolás. Ennek célja a minta maradék nélküli feloldása és a nagy szervesanyag tartalom lehető legtökéletesebb eltávolítása. Az irodalmi összefoglalóban leírtaknak megfelelően a biológiai minták roncsolására többféle módszer ismeretes. Ezek közül a leggyakoribbak a hamvasztás, a nedves légköri roncsolás és újabban a zárt térben végzett mikrohullámú roncsolás.

Jelenleg a mikrohullámú roncsolást tartják a legmegfelelőbb és leggyorsabb előkészítési módszernek biológiai minták esetében, mely képes a roncsolás során bekövetkező mintavesztések ill. szennyeződések megakadályozására. A módszer azonban drága eszközöket igényel, és erősen korlátozott az egyszerre roncsolható minta mennyisége is (maximum 0,5-1 g/bomba). A hagyományos módszerek ezért még mindig jó alternatívát kínálnak a roncsolások elvégzésére, mivel eszközigényük minimális, alkalmazásuk olcsó.

Mivel a mikrohullámú roncsolás igen érzékeny a minta mennyiségére, ezért először meghatároztam azt a legkisebb hajminta mennyiséget, mely a mikrohullámú készülékben elroncsolható, és belőle a vizsgált elemek koncentrációja még meghatározható. Indikátorként olyan elemeket választottunk ki, melyek koncentrációja a kiválasztott módszerekkel jól mérhető. Nagyobb mennyiségű (kb. 45-50 g) átlag hajmintát állítottam elő különböző személyektől származó hajminta mosásával, szárításával, 3-5 mm-es darabokra aprításával, majd alapos homogenizálásával. A további kísérletek során ezt a hajmintát használtam. A mikrohullámú készülék teflonbombáiba növekvő mintamennyiséget (0,25; 0,5; 0,75 és 1,0 g) mértem be és a mintákhoz 0,25 cm<sup>3</sup> 30 %-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot és 3,00 cm<sup>3</sup> 65 %-os HNO<sub>3</sub>-at adtam. A roncsolást a 10. táblázatban látható programmal végeztem el, majd a mintákat maradék nélkül műanyag kémcsövekbe vittem át, s 10,00 cm<sup>3</sup>-re töltöttem fel. A koncentrációkat ICP-OES, ill. GFAAS módszerrel határoztam meg.

|                |     |   |     |     |     |     |
|----------------|-----|---|-----|-----|-----|-----|
| idő/perc       | 2   | 2 | 2   | 2   | 5   | 5   |
| teljesítmény/W | 250 | 0 | 250 | 300 | 400 | 600 |

10. táblázat: az eredetileg alkalmazott roncsolóprogram

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

| elem | a különböző átlag hajminta mennyiségekre mért koncentrációk $\mu\text{g/g}$ -ban |                  |                  |                  |
|------|--|------------------|------------------|------------------|
|      | 0.25 g   | 0.5 g            | 0.75 g           | 1.0 g            |
| B    | kim. határ alatt   | 0.91 $\pm$ 0.07  | 0.99 $\pm$ 0.06  | 0.78 $\pm$ 0.18  |
| Ba   | 0.18 $\pm$ 0.04  | 0.27 $\pm$ 0.01  | 0.28 $\pm$ 0.02  | 0.22 $\pm$ 0.04  |
| Ca   | 91 $\pm$ 19  | 107 $\pm$ 3      | 109 $\pm$ 2      | 108 $\pm$ 3      |
| Cu   | 5.16 $\pm$ 0.21  | 6.81 $\pm$ 0.11  | 6.63 $\pm$ 0.09  | 6.71 $\pm$ 0.12  |
| Fe   | 7.94 $\pm$ 0.82  | 11.65 $\pm$ 0.24 | 12.07 $\pm$ 0.28 | 10.09 $\pm$ 0.53 |
| Mg   | 9.62 $\pm$ 1.76  | 12.44 $\pm$ 0.37 | 12.26 $\pm$ 0.32 | 10.39 $\pm$ 1.25 |
| Mn   | kim. határ alatt   | 0.18 $\pm$ 0.01  | 0.19 $\pm$ 0.01  | 0.07 $\pm$ 0.02  |
| Pb   | kim. határ alatt   | 6.36 $\pm$ 0.94  | 6.14 $\pm$ 0.52  | 4.92 $\pm$ 0.76  |
| Zn   | 83 $\pm$ 11  | 95 $\pm$ 2.9     | 94 $\pm$ 3.3     | 78 $\pm$ 16      |

11. táblázat: a teflonbombákban végzett hajminta roncsolások mintamennyiség-optimalása

Az eredmények kiértékelése (11. táblázat) során a következőket állapítottam meg:

- A 0,25 g-os bemérésekből származó minták esetében a kis bemért mintamennyiségből adódó kis koncentráció miatt nem volt kimutatható az ólom, a bór és a mangán. A réz, vas és cink 5-15%-os standard deviációval volt mérhető, a bárium, kalcium és magnézium esetében a szórás elérte a 20 %-ot is. Azon elemekre, amelyek koncentrációját meg tudtam határozni, abszolút értékben mintegy 20-25%-kal kisebb koncentrációt mértem, mint a többi bemérés esetében.

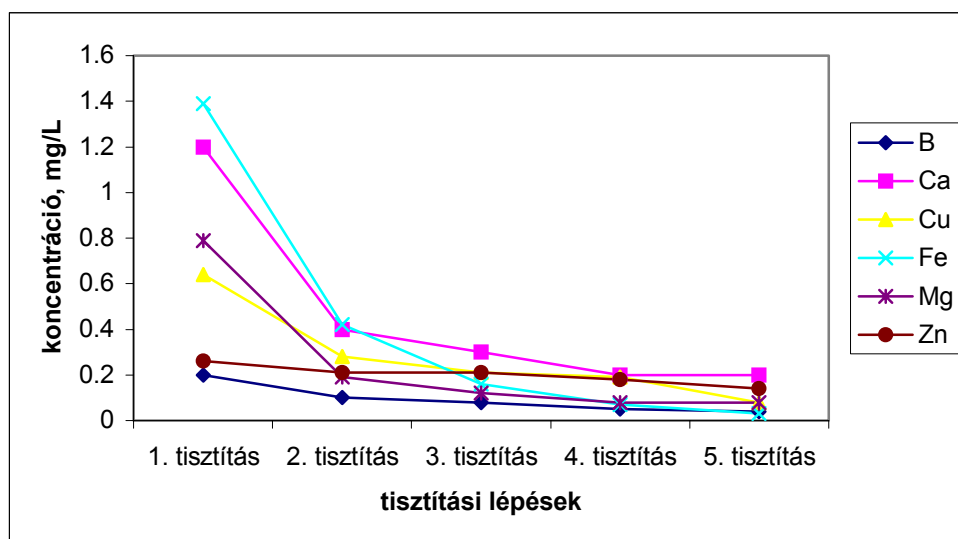
- A 0,50 illetve 0,75 g-os bemérésekből származó minták mind abszolút értékükben, mind szórásukban hasonló eredményeket szolgáltatottak. Minden kiválasztott elem jól mérhetőnek bizonyult, a legnagyobb szórást az ólom esetében tapasztaltam (14,8 %).

- Az 1,00 g-os bemérésből származó minta zavaros volt, szerves anyag maradt a bomba alján. Ezt a mintát ismételt roncsolással, több salétromsav és hidrogén-peroxid hozzáadásával sem tudtam tökéletesen elroncsolni. A teflonbomba a roncsolás során többször lefűjt a hirtelen gázfejlődés következtében. Ez mintavesztéshez vezetett, így az 1g-os bemérés nem alkalmazható az analízis során.

A kísérleti tapasztalatok alapján a teflonbombákban végzett roncsoláshoz az optimális mintamennyiséget ezért kb. 0,5 – 0,75 g-ban határoztam meg.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A teflonbombákban végzett roncsolás hátránya, hogy a bombák elhasználódása során belső faluk porózussá válik, emiatt képesek a minták nyomelem tartalmát megváltoztatni a felületen lejátszódó adszorpciós-deszorpciós folyamatok révén. Nagy elemkoncentrációjú minták roncsolása után a bombák belső falán maradt szennyeződés a következő minta roncsolása során visszaoldódhat. A bombák ezen tulajdonságának ellenőrzésére a következő kísérletet végeztem el. Nagy mangán, bárium, ólom, bór, kalcium, réz, vas és magnézium tartalmú ásványminta roncsolása után a bombákat desztillált vízzel kiöblítettem, majd a gyártó által előírt tisztító programot ötször egymás után megismételtem.



7. ábra: a teflonbombák szennyezettségének vizsgálata

Ez a program a bombák  $3,00 \text{ cm}^3$  65 %-os  $\text{HNO}_3$ -val és  $0,50 \text{ cm}^3$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal való megtöltését, majd lezárás után 10 percig 250W, ill. 10 percig 500W teljesítménnyel való melegítést jelenti a mikrohullámú készülékben. Az egyes tisztítási lépések után kapott oldatokat a fenti elemekre megvizsgálva a 7. ábrán látható eredményeket kaptam (az ábrán példaként a 4. számú bomba eredményei láthatók). A kapott eredményekből a következőket állapítottam meg:

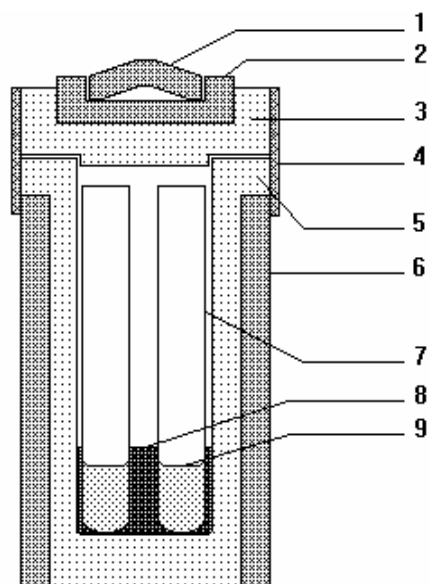
- Az egyes bombák teflonbetétjében nem azonos mennyiségben voltak jelen a vizsgált nyomelemek, egyesek erősebben, mások gyengébben szennyezettek

bizonyultak, illetve voltak olyan teflonbetétek, amelyből az adott elem nem volt kimutatható.

- Mangán, bárium és ólom szennyeződések egyike teflonbetétekből sem sikerült kimutatni.

- A bór esetében a betétek szennyezettsége megközelítette azt a koncentrációt, amelyet az egyes hajmintákból mértünk. A szennyeződést az öt egymást követő tisztítási ciklus sem távolította el teljesen a teflonbetétekből. A hajbórtartalmának meghatározása így ezzel a módszerrel nem végezhető el megbízhatóan.

- A kalcium, réz, vas és magnézium minden teflonbetétekből kimutatható volt és ezen elemek eltávolítása az öt tisztítási ciklussal sem sikerült teljesen. A mért koncentrációk kb. két nagyságrenddel voltak kisebbek, mint a hajmintákból általunk mért koncentrációk.



8. ábra: teflonbomba a behelyezett kvarckémcsővel

(1-műanyag rugó, 2-rugótartó lap, 3-teflon bombafedél, 4-teflon rögzítőgyűrű, 5-teflonbomba (120mm magas, 35mm belső átmérőjű), 6-nyomásálló védőköpeny, 7-kvarckémcső (75mm magas, 14mm külső átmérőjű), 8-a teflonbombába töltött salétromsav, 9-hajminta és salétromsav-hidrogén-peroxid elegy a kvarckémcsőben)

Mivel a fenti kísérleteim igazolták, hogy a teflonbombákban végzett roncsolás során a minta szennyeződésének lehetősége a bombákban lerakódott fémnyomok miatt a bombák használatával, igénybevételével az idő folyamán fokozatosan nő, ezért olyan roncsolási módszert kerestem, melynek segítségével ez a szennyeződés kiküszöbölhető. Erre a célra vezettem be a mikrohullámú bombákba helyezhető kvarckémcsövek alkalmazását a haj- és vérminták roncsolása során. A kvarckémcsöveket olyan méretben készítettem el, hogy belőlük 3 darab fért el a teflonedényekben (8. ábra). Az általam alkalmazott elrendezés előnyei, hogy a minták nem érintkeznek közvetlenül a bombával, a roncsolt mintákat az előzetesen 4,00 cm<sup>3</sup>-re kalibrált kémcsövekben jelre töltve elkerülhető azok jelentős hígulása, valamint az egy körben roncsolható minták száma hatról 18-ra nőtt.

Mivel a teflonbombákba helyezett kvarckémcsövek belső átmérője csak 13 mm, ezért a roncsolás során jelentős gázfejlődést produkáló minták esetén, mint amilyen a haj és a vér, a kihabzás elkerülésének érdekében a minták és a roncsoló savelegy összemérése után szobahőmérsékleten, légköri nyomáson előroncsolást alkalmaztam, és a bombákat csak a kezdeti intenzív habzás lejátszódása után (kb. 15-20 perc) zártam le. Módosítottam továbbá az eredeti roncsoló programot, amely a 12. táblázatban látható.

|                |     |   |     |   |     |   |     |   |     |
|----------------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|
| idő/perc       | 1   | 2 | 1   | 2 | 1   | 2 | 1   | 2 | 2   |
| teljesítmény/W | 250 | 0 | 250 | 0 | 250 | 0 | 350 | 0 | 400 |

12. táblázat: a módosított mikrohullámú roncsolóprogram

A kvarckémcsövekben végzett roncsolás során is elvégeztem a mintamennyiség optimalizálását 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 és 0,30 g átlag hajminta mennyiségek bemérésével. A mintákhoz 1,00 cm<sup>3</sup> 65 %-os HNO<sub>3</sub>-at és 0,10 cm<sup>3</sup> 30 %-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot adtam, a kémcsöveken kívülre pedig 5,00 cm<sup>3</sup> 65 %-os HNO<sub>3</sub>-at töltöttem.

Tapasztalataim a következők voltak:

- A 0,05 g-os bemérés esetén kapott minta nyomelem koncentrációja annyira kicsi, hogy csak a legnagyobb mennyiségben jelen lévő elemeket sikerült kimutatni az oldatból. Ezek a kalcium, a cink és a magnézium.

- A 0,10 g-os beméréseknél az oldatokból a bór, kalcium, réz, vas, magnézium és cink koncentrációját tudtam meghatározni, a bárium és mangán mennyiségét azonban nem.

- A 0,15 és 0,20 g-os bemérések esetén a mintákból minden vizsgált elem koncentrációját meg tudtam határozni, és az egyes bemérések eredményeinek szórása, tekintettel az egyes elemek kis koncentrációjára elfogadható, az ólom (17,4%) kivételével minden elemnél 13% alatti érték.

- A kvarckémcsövekbe bemért 0,25 és 0,30 g hajminta túl soknak bizonyult a roncsolás során, mert a salétromsav és hidrogén-peroxid hozzáadása után már a szobahőmérsékleten végzett légtörési előroncsolás során kihabzott a kémcsőből, ami ellenőrizhetetlen veszteséghez vezetett. Ezen minták roncsolása után az oldatban szilárd maradékot találtam. A 0,25 g-os bemérések esetén a szilárd maradék mennyisége kevés volt, de a 0,30 g-os beméréseknél a minta jelentős része nem roncsolódott el az adott körülmények között. Ezen minták újabb roncsolása további salétromsav és hidrogén-peroxid hozzáadásával nem volt lehetséges, mivel a kvarckémcsövek kis térfogata nem tette lehetővé további folyadék hozzáadását a mintákhoz. A másik lehetőség, hogy a részben feltáródott hajmintát vízfürdőn bepárolva újabb adag salétromsav és hidrogén-peroxid elegyével tárjam fel; ezt a művelet időigényessége és a minták szennyeződésének veszélye miatt elvettem.

A kísérletsorozat eredményiből megállapítottam, hogy a kvarckémcsövekben végzett mikrohullámú roncsoláshoz kb. 0,15-0,20 g hajminta bemérése a megfelelő, mert ez maradéktalanul elroncsolható az alkalmazott módszerrel, valamint koncentrációja megfelelő ahhoz, hogy az általunk kiválasztott nyomelemek mennyiségét megfelelő pontossággal határozhassam meg a mintákból nyert oldatokból.

Az elvégzett roncsolási kísérleteket összehasonlítva egyértelműen a kvarckémcsövek alkalmazása mellett szól a mintegy 60 %-kal kisebb minta- és vegyszerigény, s az, hogy megháromszorozható az egy roncsolási ciklusban feltárható minták mennyisége.

A kvarckémcsövekben, mikrohullámú készülékben végzett roncsolási módszert összehasonlítottam a nedves légtörési roncsolással, illetve a hamvasztásos mintaelőkészítéssel is.

Mindhárom kísérletsorozathoz ugyanazt az általam készített átlag hajmintát használtam fel. Az egyes mintasorozatok bemérése előtt minden esetben 1 órán át szárítottam az előkészített hajmintát 105 °C-on szárítószekrényben, s azonnal bemértem, mivel a száraz haj erősen higroszkópos tulajdonságú.

Az atmoszférikus (nyitott) rendszerben végzett nedves roncsolás során a hajminta 0,1 g-os ( $\pm 0,1$ mg) részleteit kvarckémcsövekbe mértem, hozzáadtam 0,60 cm<sup>3</sup> 65 %-os salétromsavat és 0,05 cm<sup>3</sup> 30 %-os hidrogén-peroxidot, majd a kémcsöveket furatokkal ellátott alumínium blokkba helyeztem. Az alumínium blokkot elektromos főzőlappal melegítettem. A hőmérséklet szabályozását úgy oldottam meg, hogy egy kvarckémcsőbe 65 %-os salétromsavat töltöttem, e kémcsövet a többi mellé helyeztem az alumínium blokkba, és ebbe kontakt hőmérőt állítottam. A kontakt hőmérő által vezérelt kapcsoló elektronika segítségével a minták hőmérsékletét 100-130 °C közötti hőmérsékleten tartottam. A mintákat addig melegítettem, amíg teljesen tiszta, átlátszó sárga oldatot kaptam. Ezután az oldatokat 0,1 mol/dm<sup>3</sup> salétromsavval 2,00 cm<sup>3</sup>-re töltöttem.

Az atmoszférikus nyomású (nyílt) rendszerben végzett nedves roncsolás előnye, hogy a minták bemérése, és a roncsoló savelegy hozzáadása után az alumínium blokkban a roncsolás automatikusan az előre beállított hőmérsékleten zajlik. Probléma volt viszont, hogy az alumínium blokk illetve az elektromos főzőlap nagy tehetetlensége miatt a hőmérséklet szabályozása nem bizonyult kielégítő pontosságúnak. További hátránya volt ennek a módszernek az, hogy mivel a roncsolás nyitott rendszerben játszódott le, az eltávozó gőzök folyadékcseppeket ragadhattak magukkal a forrásban lévő, erősen buborékoló oldatból, és így veszteséget okozhattak. A savelegy párolgása miatt a roncsolás időtartama alatt (3-3,5 óra) egyszer minden kémcsőbe újra salétromsavat és hidrogén-peroxidot kellett tölteni. Azok a minták, amelyeknél ezt elmulasztottam kb. 1,5 óra alatt teljesen szárazra párolódtak. Ezt a száraz maradékot további roncsolással sem sikerült maradéktalanul oldatba vinni. Ezzel a módszerrel tehát viszonylag gyorsan valósítható meg a hajminták roncsolása, de a hőmérséklet szabályozás ellenére sem lehet felügyelet nélkül hagyni a berendezést a roncsolás ideje alatt.

A zárt rendszerű mikrohullámú roncsolás során a kvarckémcsövekbe kb. 0,2 g hajmintát mértem, hozzáadtam 0,10 cm<sup>3</sup> 30 %-os hidrogén-peroxidot és 1,00 cm<sup>3</sup> 65 %-os salétromsavat, majd 3-5 órán át a mintákat légköri nyomáson,

szobahőmérsékleten előroncsolásnak vettem alá. Ezután a kémcsöveket hármásával teflonbombákba helyeztem, a bombákba a kémcsöveken kívülre 4,00 cm<sup>3</sup> 65%-os salétromsavat töltöttem (ez azért szükséges, hogy az oxidáló elegy ne desztilláljon ki a kémcsövekből a mikrohullámú készülék teflonbombájába a melegítés során). A lezárt bombákat a mikrohullámú készülékbe helyezve végeztem el a roncsolást.

Mivel a roncsolást zárt térben végeztem, a mintákból nem történt nyomelem veszteség, és a környezetből sem került a mintákba szennyeződés. A mikrohullámú készülékkel gyorsan, jól reprodukálhatóan tudtam roncsolni.

A harmadik kísérletsorozatban hamvasztásos roncsolást végeztem. A módszer segítségével sikerült az összes szerves anyagot eltávolítani a mintákból, így azok hatása nem zavarta az egyes nyomelemek koncentrációjának meghatározását. Probléma volt viszont, hogy az előhamvasztás és a hamvasztás is nyitott rendszerben történt, és a fejlődő nagy mennyiségű gázzal illetve füsttel a nyomelemek egy része is távozott a mintából. Abból a célból, hogy megakadályozzam a nyomelem veszteséget, nyomfogóként 0,20 cm<sup>3</sup> 5%-os magnézium-nitrát oldatot adtam minden bemért mintához. Ennek viszont az volt a következménye, hogy a magnézium koncentrációját nem tudtam vizsgálni a kísérlet során.

Az egyes módszerekkel roncsolt mintákból meghatározott elemkoncentrációk a 13. táblázatban találhatók. Látható, hogy mind a nedves légköri roncsolás, mind a hamvasztás során kisebb értékeket kaptunk az egyes nyomelemek koncentrációjára, mint a zárt rendszerben végzett nedves roncsolás során. Ennek oka hamvasztás esetében a nagy hőmérsékleten lejátszódó mintaveszteség, míg nedves roncsolásnál a minták fröcskölése volt. Ez alátámasztja azt a feltevést, hogy az atmoszférikus nyomású nyitott rendszerben végzett roncsolás illetve hamvasztás - a nyomfogó alkalmazása ellenére- veszteséghez vezet. Az ólom koncentrációját - illékonyága miatt - nem sikerült meghatározni sem atmoszférikus, nyílt rendszerű nedves roncsolás után, sem pedig hamvasztással előkészített mintákból. Minden módszer esetén 5 párhuzamos bemérést végeztem. Az eredmények szórása a zárt rendszerben végzett mikrohullámú roncsolással előkészített minták esetében volt a legkisebb.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

| nyomelem | mért koncentrációk, µg/g              |  |            |
|----------|---------------------------------------|--|------------|
|          | nyitott rendszerű<br>nedves roncsolás | zárt rendszerű<br>mikrohullámú roncsolás | hamvasztás |
| B        | 3,73±0,93                             | 4,05±1,21                                | 2,48±0,80  |
| Ba       | 0,23±0,21                             | 1,76±0,15                                | 1,41±0,91  |
| Ca       | 141±6                                 | 696±81                                   | 553±152    |
| Cu       | 8,31±0,82                             | 10,38±0,66                               | 7,32±1,73  |
| Fe       | 17,66±15,74                           | 19,62±1,03                               | 8,95±4,48  |
| Mg       | 20,99±2,30                            | 78,04±17,29                              | < 0,005    |
| Mn       | 0,37±0,21                             | 0,86±0,48                                | 0,50±0,13  |
| Pb       | < 0,001                               | 6,33±1,57                                | < 0,001    |
| Zn       | 122±8                                 | 161±18                                   | 127±105    |

13. táblázat: a különböző roncsolási módszerek összehasonlításának eredményei

A fenti kísérleti tapasztalatok alapján a mikrohullámú készülékkel, zárt rendszerben, nagy nyomáson, teflonbombákba helyezett kvarckémcsövekben végzett - a másik kettőnél ugyan munkaigényesebb - roncsolást találtuk a legmegfelelőbbnek a hajminták analitikai vizsgálatához.

### 5.1.2. Vér-, szérum-, és plazmaminták előkészítése

A vér-, szérum- és plazma mintavétel és előkészítés során fokozottabban jelentkeztek a már korábban is tapasztalt szennyeződési problémák, mivel bennük a vizsgált nyomelemek koncentrációja jóval kisebb, mint a hajmintákban. Az alacsony nyomelem koncentrációk miatt viszonylag jelentősebb volt a roncsoló savból származó szennyeződések hatása is. Ezért e mintákkal kapcsolatban vizsgáltam a mintavétel és tárolás eszközeiből származó szennyeződések lehetőségét, és megpróbáltam olyan alternatív roncsolási módszert keresni, amely szükségtelenné teszi az esetenként szennyezett salétromsav, ill. hidrogén-peroxid használatát a mintaelőkészítés során.

#### 5.1.2.1. Vacutainer® csövek és Eppendorf csövek tesztje

A vérvétel során alkalmazott 7 cm<sup>3</sup>-es üveg Vacutainer csöveket belső falát speciális bevonattal tették alkalmassá nyomelem-analitikai vizsgálatra vett vérminta tárolására. A sorozatban végzett mintavétel előtt ICP-MS módszerrel megvizsgáltam a vákuumcsöveket, hogy van-e belőlük olyan mértékű kioldódás, amely befolyásolhatná a vérminták nyomelem koncentrációját.

|                               | <b>Al</b> | <b>B</b> | <b>Ca</b>     | <b>Cu</b>    | <b>Fe</b>    | <b>K</b> | <b>Mg</b>     | <b>Zn</b>    |
|-------------------------------|-----------|----------|---------------|--------------|--------------|----------|---------------|--------------|
| Eppendorf cső, sav            | < 0,01    | < 0,03   | < 0,05        | 0,1          | 0,2          | 0,4      | < 0,02        | < 0,01       |
| Eppendorf cső, dv             | < 0,01    | < 0,03   | < 0,05        | < 0,05       | 0,1          | 0,6      | < 0,02        | < 0,01       |
| műanyag kcs. sav              | < 0,01    | < 0,03   | < 0,05        | 0,1          | 7,0          | 4,0      | < 0,02        | 0,3          |
| műanyag kcs. dv               | < 0,01    | < 0,03   | 0,3           | 2,0          | 3,0          | 2,0      | < 0,02        | < 0,01       |
| Vacutainer sav                | < 0,01    | < 0,03   | 0,8           | 1,0          | 6,0          | 6,0      | 0,1           | 0,2          |
| Vacutainer dv                 | < 0,01    | < 0,03   | 0,3           | 3,0          | 6,0          | 8,7      | 0,1           | 0,9          |
| koncentráció a vérben<br>[88] | 1-5       | 15-45    | 57,5-<br>78,0 | 800-<br>1100 | 800-<br>1200 | 1600     | 27,1-<br>45,8 | 800-<br>1100 |

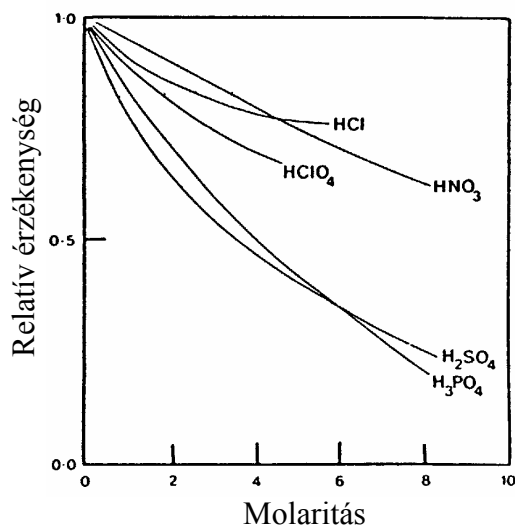
14. táblázat: a Vacutainer csövek és Eppendorf csövek tesztjének eredményei  
(adatok µg/dm<sup>3</sup>-ben, n=6)

A kísérlet során 6 Vacutainer csövet és összehasonlítás céljából 6, a minták tárolására használatos nagytisztaságú műanyag kémcsövet használtam. A vákuumcsövek és műanyag kémcsövek egyik részét ioncserélt vízzel (Milli-Q), másik felét  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  salétromsavval töltöttem fel, majd a szobahőmérsékleten egy hétig tárolt oldatokat a vizsgált elemekre ICP-MS módszerrel elemeztem. Hasonló módon vizsgáltam a minták tárolására, ill. mérés előtti hígítására használt Eppendorf csöveket is ( $1,5 \text{ cm}^3$  térfogat, Merck). Az eredmények a 14. táblázatban láthatók. Az eredmények alapján a Vacutainer csövekből desztillált víz, ill.  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  salétromsav hatására kioldódó elemek mennyisége Ca, K, Fe, Zn és Mg esetében nagyobb ugyan, mint a nagytisztaságú műanyag kémcsövekből kioldódó szennyeződés, de legalább 1-2 (néhány esetben 3-4) nagyságrenddel így is alatta marad a vérmintákból várható koncentrációknak. Az Eppendorf csövek esetében a mért koncentrációk a legtöbb elemnél a kimutatási határ közelében, ill. az alatt voltak. Mivel a Vacutainer csövekből és az Eppendorf csövekből a  $1,0 \text{ mol/dm}^3$  salétromsav sem oldott ki jelentősebb elem mennyiséget, ezért azokat megfelelőnek találtam a minták rövidebb idejű (néhány napos) tárolására, ill. előkészítésére.

### 5.1.2.2. Vérminták mikrohullámú roncsolása

A vérminták roncsolására az 5.1.3. fejezetben részletezett módosított mikrohullámú roncsolási módszert alkalmaztam. Mintavétel után az alvadásgátlót (Na-heparin) tartalmazó teljes vért centrifugálással választottam szét plazma és vörösvértest (VVT) frakcióra. Az alvadásgátlóval ellátott teljes vérből és a centrifugálással nyert plazmából a vizsgálatokhoz szükséges mennyiséget (kb.  $0,6 \text{ cm}^3$ )  $1 \text{ cm}^3$ -es műanyag Eppendorf-csővekben tároltam  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra hűtve. A mintákat csak közvetlenül az előkészítéshez történő bemérés előtt olvasztottam ki. A vér és plazma minták roncsolása mikrohullámú berendezésben (MILESTONE mls 1200 Mega) történt, nagynyomású (120 bar) teflonbombákban. A mintákat nem közvetlenül a teflonbombákba, hanem kalibrált térfogatú, passzívált, nagy tisztaságú kvarc kémcsövekbe mértem. A mintákhoz adtam a roncsoláshoz szükséges savelegyet, majd a korábban részletezett módon elvégeztem a roncsolást.

Az irodalmi adatok és tapasztalataink szerint a minták savkoncentrációja jelentősen befolyásolhatja az adott koncentrációban jelenlévő elemtől származó analitikai jel intenzitását, így az adott elem kimutatási határát is. A 9. ábrán látható, hogy az irodalmi adatok szerint az alkalmazott salétromsav koncentrációjának növelésével a mért analitikai jel intenzitása nagymértékben csökken.

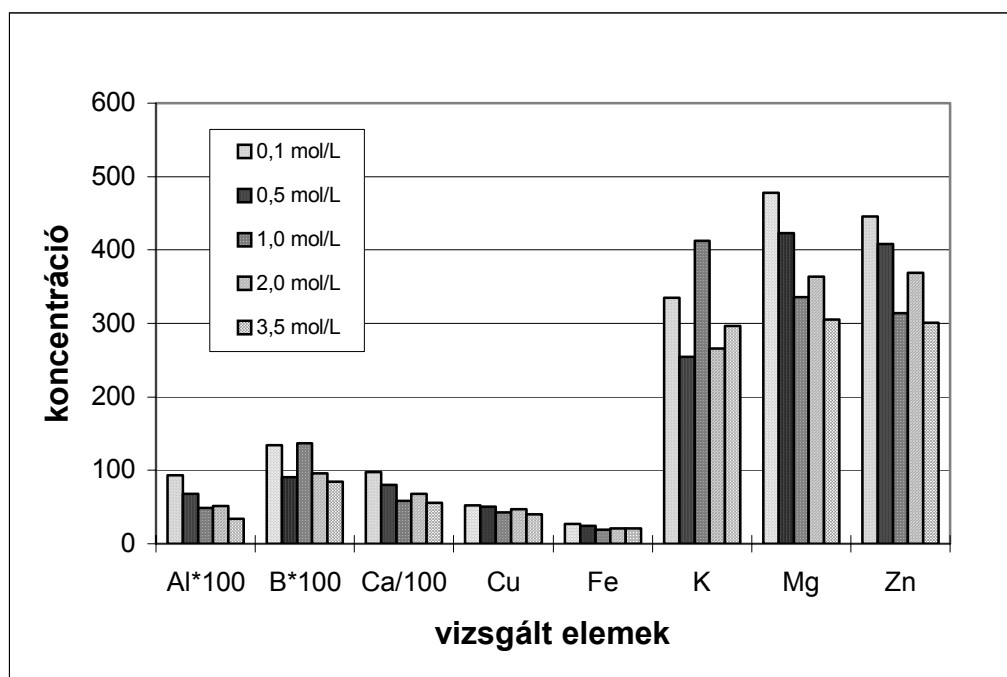


9. ábra: a savkoncentráció hatása a relatív érzékenységre [102]

Ezért kísérleteket végeztem az általam vizsgált minták esetében az ideális salétromsav-koncentráció meghatározására. A kísérletekhez ugyanazon vérminta 0,6 cm<sup>3</sup>-es részleteit roncsoltam el, a mintákat szárazra pároltam, majd a szilárd maradékot különböző koncentrációjú (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,5 mol/dm<sup>3</sup>) salétromsavval vittem oldatba és megmértem a minták elemkoncentrációját.

A 10. ábrán látható eredmények szerint a savkoncentráció növelése valóban jelentősen csökkentheti a mért analitikai jel intenzitását, és emiatt a számított koncentrációt is abban az esetben, ha a kalibráló oldatok és a minták savkoncentrációja különböző. A várt tendencia nem igazolódott az általam mért elemek közül a káliumra, és eltéréseket tapasztaltam Mg és Zn esetében is. Megállapítottam továbbá, hogy a jel nem azonos mértékben csökkent minden elemre a savkoncentráció növelésének hatására. Bizonyos elemeknél az intenzitás csökkenés igen nagy volt, pl. alumíniumnál 60%, kalciumnál 40%, magnéziumnál és cinknél 25-30%, míg más elemeknél a megfigyelt változás jóval kisebb, pl. vas

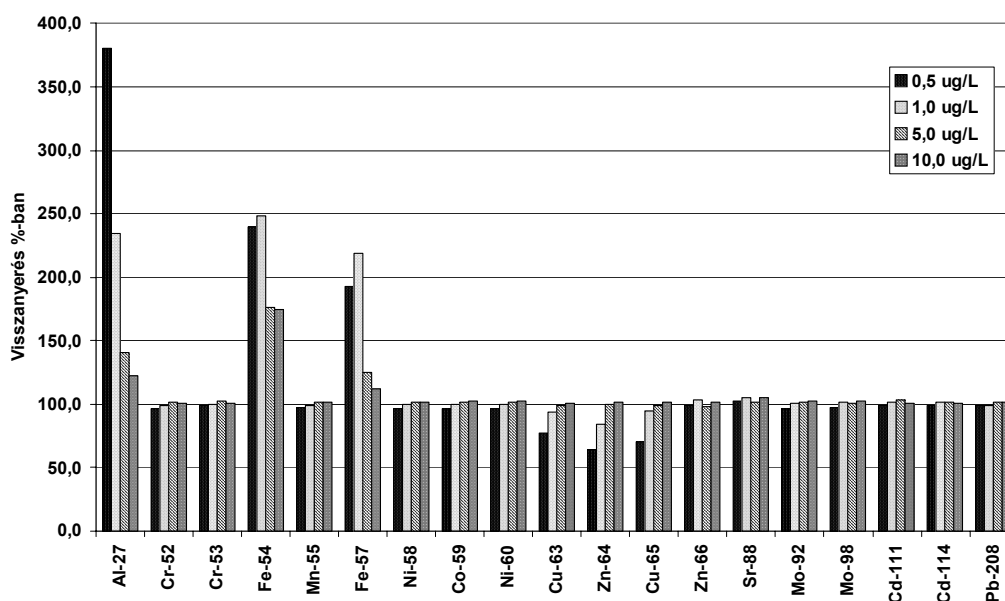
és réz esetében 5-15%. Ez arra enged következtetni, hogy a savkoncentráció nem csak az oldat porlasztási tulajdonságait, ill. a mintabeviteli hatásfokot változtatja meg, hanem más módon is hatással van a mért analitikai jelre.



10. ábra: a salétromsav koncentráció hatása a vérmintákból meghatározott koncentrációra (adatok µg/g-ban, n=5)

A kvarckémsövekkel kombinált mikrohullámú roncsolási módszer teljesítőképességét megfelelő referencia anyag hiányában standard addíciós kísérletekkel vizsgáltam, melynek során ugyanazon humán szérum minta roncsoláshoz bemért részleteihez különböző mennyiségű multielemes standard oldatot adtam, és a roncsolás után kapott oldatokból ICP-MS módszerrel meghatároztam a hozzáadott elemek visszanyerését. A 11. ábrán látható eredmények szerint a vizsgált elemek közül a Cr, Mn, Ni, Co, Zn, Sr, Mo, Cd és Pb esetében a legkisebb hozzáadott koncentrációnál (0,5 µg/L) is közel 100 %-os volt a visszanyerés. Néhány elemnél (a Cu mindkét vizsgált izotópja,  $^{64}\text{Zn}$ ) a kisebb addíciónál mennyiségek visszanyerése nem volt megfelelő. A vas irreálisan magas eredményét az  $m/z=54$ , ill.  $57$ -nél fellépő molekuláris interferenciák (pl.  $\text{Ar}^{14}\text{N}^+$ ,

Ar<sup>16</sup>OH<sup>+</sup>) okozták. Az alumínium esetében kapott magas visszanyerések oka jelentős interferencia lehetőségek hiányában a minták szennyeződése volt.



11. ábra: szérumszstandard addíciós kísérletek eredményei

### 5.1.2.3. Roncsolások TMAH oldattal

A salétromsav – hidrogén-peroxid eleggyel mikrohullámú készülékben végzett roncsolások során megfigyeltem, hogy a humán vér-, szérums- és plazmaminták alumínium koncentrációja néhány esetben a gondos mintakezelés ellenére is jóval magasabb volt, mint az irodalomban referált értékek. A lehetséges szennyező források vizsgálata során kiderült, hogy a roncsoláshoz használt suprapur minőségű vegyszerek bizonyos esetekben a mintával összemérhető, vagy attól nagyobb koncentrációban tartalmaztak alumíniumot. A roncsolások során alkalmazott salétromsavból, hidrogén-peroxidból és hidrogén-fluoridból (melyet akkor adtam a roncsolni kívánt mintához ha a nagy szervesanyag tartalom miatt a salétromsav – hidrogén-peroxid eleggyel végzett roncsolás után a mintában szilárd anyag maradt vissza) a kész mintákban mérhetővel megegyező koncentrációjú oldatokat

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

készítettem. Az oldatokat az általam használt, bontott csomagolású vegyszerekkel és frissen bontott anyagokkal is elvégeztem, hogy az utólag bevitt szennyeződés lehetőségét kizárjam. Az oldatokat ICP-MS módszerrel elemezve a 15. táblázatban látható eredményeket kaptam.

| Minta   | Al koncentráció µg/L-ben |
|---|--------------------------|
| Suprapur HNO <sub>3</sub> , 65%-os              | 0-3                      |
| Suprapur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%-os | < 0,01                   |
| Suprapur HF, 40%-os                             | 2700-3100                |
| Humán szérum (egészséges) [88]                  | 1-5                      |

15. táblázat: a roncsoláshoz használt vegyszerek alumínium szennyeződése

A hidrogén-peroxid nem tartalmazott kimutatható mennyiségű alumíniumot. Ezzel szemben a salétromsav a mintákkal összemérhető mennyiségben tartalmazott alumíniumot, a néhány esetben alkalmazott hidrogén-fluorid pedig azoknál jóval nagyobb koncentrációban.

E problémák kiküszöbölésére vezettem be a trimetil-amin vizes oldatával (TMAH) végzett roncsolást. Ennek során a humán szérum minták 0,50 cm<sup>3</sup>-es részletét 0,50 cm<sup>3</sup> 25 %-os, 0,2 % EDTA-t tartalmazó, félvezető tisztaságú TMAH oldattal elegyítettem, majd 30 perc roncsolás után a vizsgált elemek koncentrációját meghatároztam.

| Elemek | Mikrohullámú roncsolás | TMAH-s roncsolás                             |
|--------|------------------------|--|
| Al     | 8.0-55.2               | 0.98-1.74                                    |
| Cr     | (42.8-59.3)*           | (88.58-99.90)*                               |
| Mn     | 2.27-5.05              | 1.45-2.39                                    |
| Fe     | 1282-2050              | nem mérhető molekuláris interferenciák miatt |
| Co     | 0.22-0.88              | 0.01-0.08                                    |
| Ni     | 0.03-16.33             | 3.21-3.73                                    |
| Cu     | 691-1003               | 778-1124                                     |
| Zn     | 591-1217               | nem mérhető molekuláris interferenciák miatt |
| Sr     | 30.37-47.37            | 26.7-41.26                                   |
| Mo     | 0.73-1.19              | 0.72-1.34                                    |
| Cd     | 0.02-0.62              | 0.01-0.15                                    |
| Pb     | 0.02-2.70              | 0.08-0.50                                    |

16. táblázat: szérum minták mikrohullámú és TMAH-val végzett roncsolásának eredményei (adatok µg/L-ben) \*: szennyeződés a mintavétel során (vérvételi tű)

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Ezzel a módszerrel a mintaelőkészítés során sikerült kiküszöbölni a salétromsavból származó alumínium szennyeződést. Ugyanazon minta salétromsav – hidrogénperoxid eleggyel végzett roncsolása és TMAH-s roncsolása után kapott analitikai eredményekből (16. táblázat) látható, hogy az eredmények néhány elem esetében jól egyeznek (Cu, Sr, Mo), míg másoknál jelentős eltéréseket mutatnak (Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cd). E különbségek a mintamátrix jelentős eltérésének és szennyeződésének tudható be. Hasonló okokra vezethető vissza a két módszerrel előkészített szérum mintákra meghatározott kimutatási határok különbsége is (17. táblázat).

| Elemek | Mikrohullámú roncsolás (savas) | TMAH roncsolás                               |
|--------|--------------------------------|--|
| Al     | 0.125                          | 0.095  |
| Cr     | 0.030                          | 0.067  |
| Mn     | 0.005                          | 0.050  |
| Fe     | 0.406                          | nem mérhető molekuláris interferenciák miatt |
| Co     | 0.003                          | 0.175  |
| Ni     | 0.023                          | 0.040  |
| Cu     | 0.017                          | 0.015  |
| Zn     | 0.120                          | nem mérhető molekuláris interferenciák miatt |
| Sr     | 0.014                          | 0.012  |
| Mo     | 0.003                          | 0.020  |
| Cd     | 0.002                          | 0.004  |
| Pb     | 0.008                          | 0.008  |

17. táblázat: ICP-MS kimutatási határok (adatok µg/L-ben)

A savas roncsolással előkészített és a TMAH oldattal roncsolt mintákra meghatározott kimutatási határokat (17. táblázat) összehasonlítva látható, hogy Cr, Mn, Co, Ni, Mo és Cd esetében a kimutatási határ savas roncsolás után volt jobb, míg az Al, Cu és Sr a TMAH-s roncsolás után detektálható érzékenyebben. Ennek oka, hogy a TMAH-s mintelőkészítés után nyert oldat szervesanyag-tartalma jóval nagyobb, mint mikrohullámú mintaelőkészítés esetén, így megnő a szerves fragmentumokból származó molekuláris interferenciák lehetősége. Ez legélesebben a Fe, Co és Zn esetében látszik.

Mivel a savas roncsolással végzett standard addíciós kísérletek és az 5.1.3. pontban részletezett referencia mintákkal végzett ellenőrzés az elemekre az alumínium kivételével megbízható eredményeket adott, a TMAH-val végzett mintaelőkészítést

a továbbiakban csak a szérum minták alumínium koncentrációjának meghatározása során alkalmaztam.

### 5.1.3. Kis mennyiségű referencia minták roncsolása és analízise

Az analitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása során a referencia anyagoknak igen fontos szerepük van. Alkalmazásuk célja egyrészt a kifejlesztett mintaelőkészítési, analitikai lépések teljesítőképességének vizsgálata és az esetleges szennyező források vagy mintaveszteség felderítése, másrészt a módszer rutin alkalmazása során az eredmények pontosságának és megbízhatóságának folyamatos ellenőrzése.

A módszerek vizsgálatát és folyamatos ellenőrzését különösen fontossá tette az, hogy munkám során törekedtem a lehető legkisebb mintamennyiségek alkalmazására, melyeknél fokozottabban jelentkezik a mintaveszteség és a kontamináció veszélye. A roncsolási és analitikai módszer vizsgálata során a referencia mintát olyan mennyiségben kell alkalmazni, amely megfelel az analízisre kerülő valódi mintákból rendelkezésre álló mennyiségnek, hiszen a módszer – különösen a mintaelőkészítés – erősen függ a rendelkezésre álló minta mennyiségétől is. Problémát jelentett viszont, hogy a referencia anyagok esetében a bizonylatokon szereplő nyomelem koncentrációk visszanyerését (és a megfelelő homogenitást) csak akkor szavatolja a gyártó, ha legalább az általa meghatározott és a bizonylaton rögzített mennyiséggel végezzük az analízist.

| <b>Referencia minta megnevezése</b> | <b>Minimálisan szükséges mintamennyiség, mg</b> |
|-------------------------------------|---|
| NIST SRM 1577b Bovine Liver         | 250   |
| NCS DC 73347 Human Hair             | 500   |

18. táblázat: az alkalmazott referencia anyagok szavatolt koncentrációjának visszanyeréséhez szükséges mintamennyiségek

Az általam kiválasztott NIST SRM 1577b Bovine Liver és NCS DC 73347 Human Hair standard referencia anyagok esetében ezek a gyártó által meghatározott mennyiségek a 18. táblázatban láthatók. Ezek az értékek munkám során néhány

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

esetben akár egy nagyságrenddel is nagyobbak voltak, mint a vizsgált haj, ill. vérminták mennyisége. Ezeket a szükséges mintamennyiségeket a gyártók a minta (in)homogenitásának függvényében határozzák meg.

A referencia anyagokkal végzett kísérleteim során ezért a kifejlesztett módszer teljesítőképességének vizsgálatán túl választ kerestem arra is, hogy a kiválasztott referencia anyagok nyomelemtartalma milyen visszanyeréssel határozható meg akkor, ha az ajánlottnál jóval kisebb mintamennyiséggel végzem el a meghatározást, illetve alkalmasak-e ezek a referencia anyagok az analitikai módszer ellenőrzésére akkor, ha az ajánlottnál kisebb mintamennyiségekkel kell dolgozni.

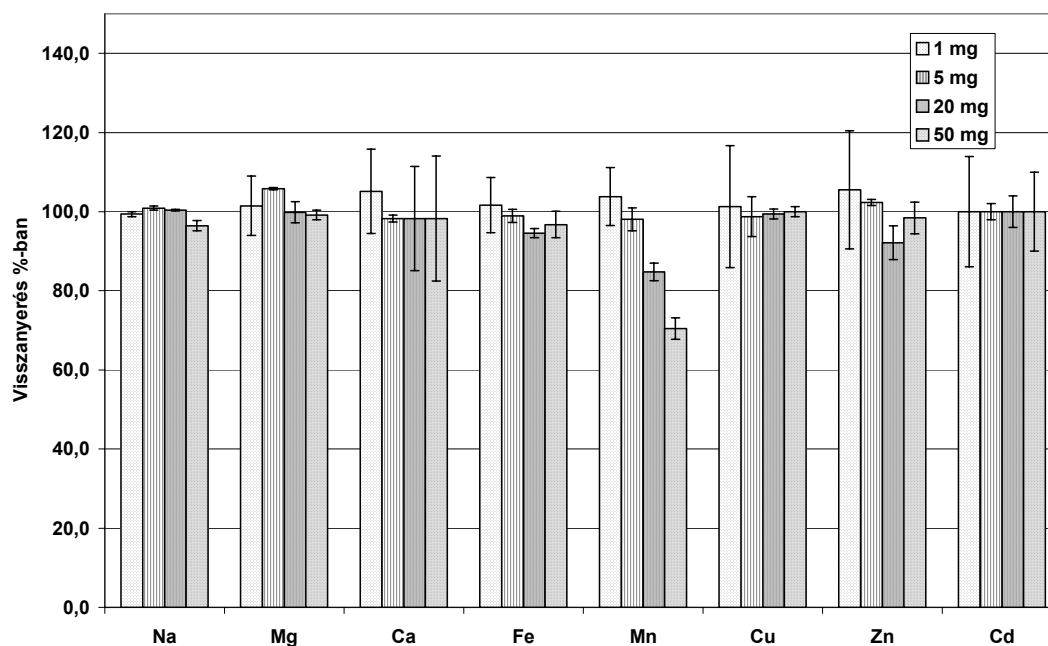
A referencia minták roncsolását zárt rendszerben, mikrohullámú készülékben, teflonbombákba helyezett betétekben végeztem. Mivel az előzetes kísérletek során a referencia anyagokban kis mennyiségű szilikátot találtam, ezért a tökéletesebb roncsolás érdekében a roncsoló savelegyhez minden esetben 0,1 cm<sup>3</sup> hidrogén-fluoridot is adtam.

A referencia anyagokból 1, 5, 20 és 50 mg-os mennyiségeket roncsoltam el, majd a kapott oldatok elemkoncentrációit ICP-MS és ICP-OES módszerekkel határoztam meg. Mindkét referencia mintából, minden mintamennyiség esetén 10 párhuzamos roncsolást és mérést végeztem. A párhuzamos bemérésekre kapott eredményeket átlagoltam, és kiszámoltam a visszanyerési százalékot is a szavatolt koncentrációkhoz képest.

|    | Mérési eredmények µg/kg-ban, a bemért mintamennyiség szerint |          |          |          | Szavatolt értékek |
|----|--|----------|----------|----------|-------------------|
|    | 1 mg   | 5 mg     | 20 mg    | 50 mg    |                   |
| Na | 2405±15  | 2442±13  | 2430±5   | 2334±30  | 2420±60           |
| Mg | 610±46   | 636±2    | 600±16   | 596±7    | 601±28            |
| Ca | 122±13   | 114±1    | 114±15   | 114±18   | 116±4             |
| Fe | 187±13   | 182±3    | 174±2    | 178±6    | 184±15            |
| Mn | 10.9±0.8   | 10.3±0.3 | 8.9±0.2  | 7.4±0.2  | 10.5±1.7          |
| Cu | 162±25   | 158±8    | 159±2    | 160±2    | 160±8             |
| Zn | 134±20   | 130±1    | 117±5    | 125±5    | 127±16            |
| Cd | 0.5±0.07   | 0.5±0.01 | 0.5±0.02 | 0.5±0.05 | 0.5±0.03          |

19. táblázat: a NIST SRM 1577b Bovine Liver minta mérési eredményei különböző mintamennyiségek esetén (n=10)

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



12. ábra: a NIST SRM 1577b Bovine Liver minta visszanyerési eredményei

A NIST SRM 1577b Bovine Liver minta mérési eredményei és visszanyerési adatai a 19. táblázatban és a 12. ábrán láthatók. E mintában a Na, Mg, Fe, Cu és Zn szerepel nagy mennyiségben, a Mn és Cd pedig nyomnyi mennyiségben. Az elemek közül a mangán kivételével minden elemre és minden mintamennyiségre igen jó visszanyeréseket tapasztaltam. A mangán esetében a mért koncentrációk jól egyeztek a szavatolt értékkel az 1 és 5 mg-os mintamennyiségekre, azonban a minta mennyiségének növelésével a visszanyerés csökkent, valószínűleg a mintamátrixból származó molekuláris interferenciák növekedése miatt.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

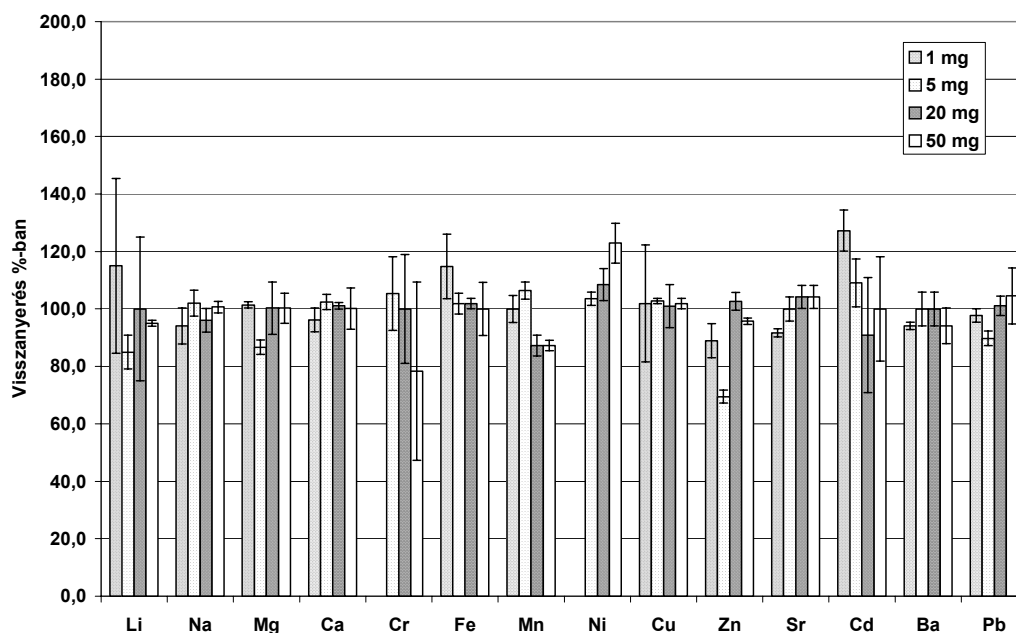
|                 | Mérési eredmények $\mu\text{g/g}$ -ban, a bemért mintamennyiség szerint |           |           |           | Szavatolt értékek |
|-----------------|---|-----------|-----------|-----------|-------------------|
|                 | 1 mg  | 5 mg      | 20 mg     | 50 mg     |                   |
| Li              | 2.3±0.7   | 1.7±0.1   | 2±0.5     | 1.9±0.02  | 2±0.1             |
| Na              | 143±9   | 155±7     | 146±6     | 153±3     | 152±10            |
| Mg              | 365±4   | 312±8     | 361±33    | 361±19    | 360±30            |
| Ca <sup>a</sup> | 2790±115  | 2970±79   | 2931±35   | 2905±208  | 2900±200          |
| Cr              | 1.87±0.48   | 0.39±0.05 | 0.37±0.07 | 0.29±0.09 | 0.37±0.05         |
| Fe              | 62±7  | 55±2      | 55±1      | 54±5      | 54±6              |
| Mn              | 6.3±0.3   | 6.7±0.2   | 5.5±0.2   | 5.5±0.1   | 6.3±0.5           |
| Ni              | 2.37±0.39   | 0.86±0.02 | 0.90±0.05 | 1.02±0.07 | 0.83±0.15         |
| Cu              | 10.8±2.2  | 10.9±0.1  | 10.7±0.8  | 10.8±0.2  | 10.6±0.7          |
| Zn              | 169±10  | 132±3     | 195±6     | 182±2     | 190±5             |
| Sr              | 22±0.3  | 24±1      | 25±1      | 25±1      | 24±1              |
| Cd              | 0.14±0.01   | 0.12±0.01 | 0.10±0.02 | 0.11±0.02 | 0.11±0.02         |
| Ba              | 16±0.2  | 17±1      | 17±1      | 16±1      | 17±1              |
| Pb              | 8.6±0.2   | 7.9±0.2   | 8.9±0.3   | 9.2±0.9   | 8.8±0.9           |

<sup>a</sup> ICP-OES eredmények

20. táblázat: az NTS DC 73347 Human Hair CRM minta mérési eredményei különböző mintamennyiségek esetén (n=10)

Az NTS DC 73347 Human Hair CRM minta eredményeit és a visszanyerési adatokat a 20. táblázat és a 13. ábra tartalmazza. A kiválasztott elemek közül a Na, Mg és Zn elemeket nagy mennyiségben, a Li, Cr, Mn, Ni, Cu, Sr, Ba és Pb elemeket nyomnyi mennyiségben a Cd-ot pedig ultranyomnyi mennyiségben tartalmazta. Jó egyezést tapasztaltam a mért és a szavatolt értékek között a Na, Mg, Fe, Mn, Cu, Sr, Cd, Ba és Pb esetében, viszont a Ni és Cr eredményeket az 1 mg-os mintasorozatban nem tudtam kiértékelni, mivel a minták ezekkel az elemekkel jelentősen szennyeződtek az előkészítés során. A Cd és a Li visszanyerési eredményei a szavatolt értéknél nagyobbak voltak, Zn esetében pedig vesztséget figyeltem meg az 1 és 5 mg-os mintamennyiségeknél.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



13. ábra: NCS DC 73347 Human Hair CRM minta visszanyerési eredményei

A fenti eredmények alapján látható, hogy mind a kifejlesztett roncsolási eljárás, mind az analitikai módszer a legtöbb vizsgált elem esetében alkalmas igen kis (néhány mg) mintamennyiség megbízható, gyors roncsolására és analitikai vizsgálatára, a mért értékekhez képest elhanyagolható mintaveszteség ill. szennyeződés mellett.

A fenti két referencia mintával kapcsolatban az eredmények alapján megállapítottam, hogy közülük, bár a Bovine Liver mintára adott meg a gyártó a legkevesebb elemre szavatolt koncentrációt, e mintát homogenitása alkalmassá teszi arra, hogy – a mangán kivételével - az ajánlott koncentrációnál jóval kisebb mennyiségben alkalmazzam a módszerek ellenőrzésére. Bár a Human Hair minta bizonylata több elemre tartalmazott szavatolt értékeket, ennél a mintánál nagyobb eltéréseket tapasztaltam a szavatolt koncentrációktól, még viszonylag nagyobb mintamennyiségek (20, ill. 50 mg) esetén is. E mintát a további vizsgálatok során csak az ajánlott mintamennyiség betartásával alkalmaztam.

### **5.3. Az alumínium lehetséges forrásai a műveseállomáson**

Amint azt már korábban is említettem, a rendszeres hemodialízis kezelés alatt álló betegek esetében különösen fontos a szervezetbe kerülő toxikus elemek közül az alumínium. A szájon át bekerülő alumínium nem jelent számottevő veszélyt sem az egészséges személyekre, sem a betegekre nézve. HD betegek esetében azonban az alumínium lehetséges forrásai kibővülnek a kezelés során használt oldatokkal, vízzel, gyógyszerekkel is, de a leglényegesebb, hogy e forrásokból az alumínium közvetlenül a véráramba kerül be, ami azért veszélyes, mert stabil fehérje komplexek formájában a vérben akkumulálódik, és a dialízis kezelés nem alkalmas arra, hogy az erősen kötött alumíniumot a vérből eltávolítsa.

#### **5.3.1. A víztisztító berendezés**

Az irodalomban a szerzők az alumínium lehetséges fő forrásaként a dialízishez használt vizet, és ezzel összefüggésben a dializáló berendezés felépítését, alkatrészeit, és a tisztítás során felhasznált segédanyagokat jelölik meg [7,8,98,99], és fontosnak tartják ezek rendszeres ellenőrzését is. A fentiek miatt vizsgálataim során a kis mennyiségű alumínium meghatározására kifejlesztett analitikai módszereket alkalmazva elvégeztem a Műveseállomáson a tisztító berendezés átfogó vizsgálatát abból a szempontból, hogy lehetséges-e az adott tisztító berendezés alkalmazása mellett a tisztított víz alumínium tartalmának növekedése. A művese állomáson a víz tisztítása egy többlépcsős, ioncserén és reverz ozmózisra alapuló berendezés alkalmazásával történik. A tisztítás lépései a következők:

1. A készülékbe érkező csapvizet ioncserélő gyantával ionmentesítik, kevert ágyas ioncserélő oszlopokon.
2. Az ioncserélt vizet aktív szénrel töltött oszlopon szűrik keresztül, a víz szabad klórtartalmának eltávolítása céljából.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3. A szűrt, ioncserélt vizet reverz ozmózis segítségével tisztítják és ionmentesítik tovább.
4. A tisztított víz csíramentesítése a tárolótartályba vezetés előtt UV sugárzással történik.

A tisztító berendezésbe érkező vízből, az ioncserélt vízből, az aktív szénen átszűrt vízből és a reverz ozmózissal tisztított vízből 1-1 liter mintát vettem előzetesen gondosan kitisztított polietilén palackokba, és a mintát a helyszínen nagy tisztaságú salétromsavval savanyítottam meg. Az analízis megkezdéséig a minták tárolása hűtőszekrényben történt. A mintákból 100-100 cm<sup>3</sup>-t mikrohullámú készülékben, TPX anyagú, nagy tisztaságú műanyag főzőpoharakban szárazra pároltam 80-85 °C-on, majd a szilárd maradékot 1 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> salétromsavval oldottam fel. E minták elemzése GFAAS módszerrel történt.

|   | <i>Si</i> | <i>Mg</i> | <i>Cu</i> | <i>Al</i> | <i>Ca</i> | <i>Mn</i> | <i>Pb</i> | <i>Cr</i> |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Vak (színképszén)</i>                    | +         | +         | +         | -         | -         | -         | -         | -         |
| <i>Szeleptömb</i>                           | ++        | ++        | +         | +++       | +         | +         | +         | +         |
| <i>Sópasztilla</i>                          | +         | +         | +         | +         | -         | -         | -         | ++        |
| <i>Használt aktív szén a cserepatronból</i> | ++        | ++        | -         | ++        | ++        | +         | -         | -         |
|   | <i>Na</i> | <i>Mo</i> | <i>Ni</i> | <i>Ba</i> | <i>B</i>  | <i>Sr</i> | <i>Ti</i> |           |
| <i>Vak (színképszén)</i>                    | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |           |
| <i>Szeleptömb</i>                           | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         |           |
| <i>Sópasztilla</i>                          | +++       | +         | +         | -         | -         | -         | -         |           |
| <i>Használt aktív szén a cserepatronból</i> | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +         |           |

Jelmagyarázat:

- : nem mutatható ki a mintából
- + : nyomnyi mennyiségben kimutatható
- ++ : nagyobb mennyiségben kimutatható
- +++ : alapanyag

21. táblázat: a művese állomásról származó szilárd minták spektrográfias tájékoztató mennyiségi elemzésének eredményei

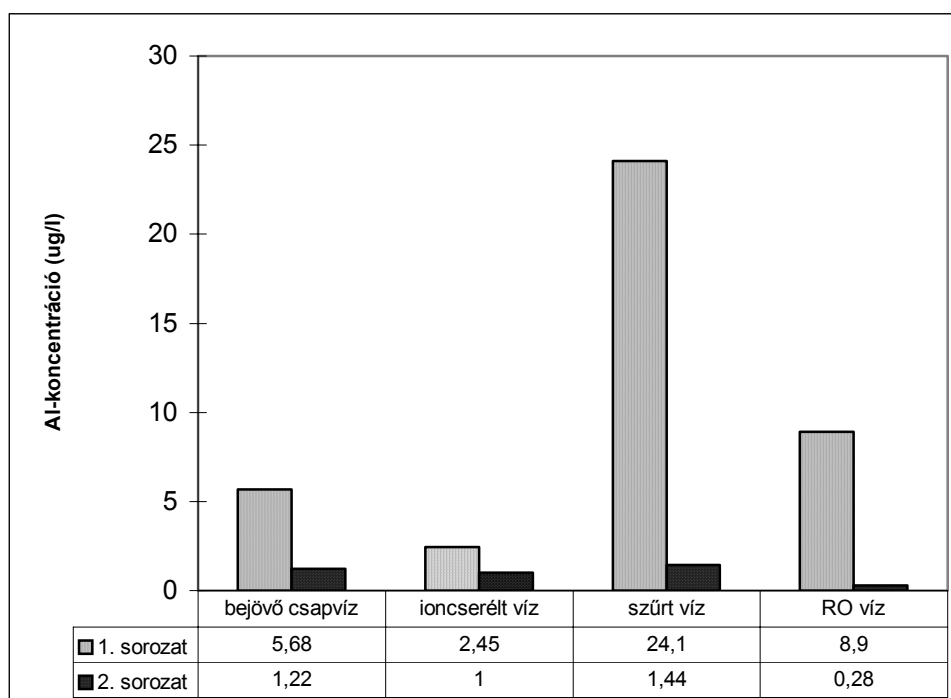
A mintavételt két alkalommal, egy hét különbséggel végeztem el, és az alumínium mennyiségét mindkét sorozatban meghatároztam. A tisztított víz vizsgálatán túl a berendezés részeit és az alkalmazott segédanyagokat is vizsgáltam. Ennek során kis mennyiségű (0,1-0,2 g) reszelék mintát vettem a vízzel érintkező fém alkatrészekből, és nagyobb mennyiséget (néhány g) a szűrésre használt aktív szénből és az ioncserélő regenerálására szolgáló sóoldat elkészítéséhez használt sópasztillából is. A szilárd minták tájékoztató mennyiségi elemzését spektrográfias módszerrel végeztem el.

A szilárd minták spektrográfias tájékoztató mennyiségi elmezéseinek eredményei a 21. táblázatban láthatók. A minták furatos grafitelektródba rögzítése során használt aldehid alapú gyanta és színeképszén kis mennyiségű szilíciumot, magnéziumot és rezet tartalmazott. A tisztító berendezésben két helyen is megtalálható szeleptömbnek azonban a nagy mennyiségű szilícium és magnézium, valamint a nyomokban előforduló réz, kalcium, magnézium, ólom és króm mellett alumínium az alapanyaga, mely alumínium forrásként szerepelhet a tisztítás alatt álló víz számára. Az ioncserélő gyanta regenerálására szolgáló nártium-klorid pasztillák kis mennyiségben tartalmaztak szilíciumot, magnéziumot, rezet, alumíniumot, molibdént és nikkelt is, míg nagyobb mennyiségben krómot. Ezeknek a forrása valószínűleg a sópasztilla készítése során alkalmazott présszerszám volt. A klórmentesítésre használt aktív szén patron töltete is jelentős mennyiségben tartalmazott alumíniumot. Mivel a mintavétel során csak a cserére váró, használt aktív szén vizsgálatát állt módomban elvégezni, ezért nem tudtam meghatározni, hogy ez az alumínium mennyiség már az új aktív szénben is jelen van, vagy csak a használat során halmozódik fel benne. Az aktív szénben az alumíniumon kívül még szilíciumot, magnéziumot és kalciumot nagyobb mennyiségben, míg mangánt, báriumot, bórt, stronciumot és titánt nyomnyi mennyiségben tudtam kimutatni.

### 5.3.2. A dialízishez használt víz

A dialízis kezelés során a betegek vére igen nagy mennyiségű (akár 100-150 liter) mosófolyadékkal érintkezik, amely tisztított, fertőtlenített vízből és megfelelő sókoncentrátumból készül, ezért igen fontos, hogy a mosófolyadék elkészítéséhez használt víz a lehető legkevesebb alumíniumot tartalmazza. Az egyes tisztítási lépéseken áthaladó víz alumínium koncentrációja látható a 14. ábrán. Azt tapasztaltam, hogy a két sorozatban végzett elemzés során a minták alumínium tartalma hasonló módon változott a tisztítás egyes lépéseiben. Mivel az első sorozatban már a bejövő csapvíz alumínium tartalma is jóval nagyobb volt, mint a második esetben, itt a változások is sokkal markánsabbak. A tisztításra kerülő csapvíz alumínium koncentrációja az ioncsere során nagymértékben lecsökkent, majd az aktív szénen való szűrés során megnőtt. Ez a növekedés az első sorozatban többszörös, a második sorozatban viszont kevésbé jelentős. Az eredmények alapján feltételezem, hogy a csapvíz nagy alumínium tartalma, melyet az alkalmazott ioncserélő gyanta nem képes megfelelő mértékben csökkenteni, felhalmozódik az aktív szenes oszlop töltetén, ami az aktív szén telítődését okozza, majd az alumínium fokozatos visszaoldódásához vezet. Ez az alumínium koncentrációjának növekedését okozza, és ezt a nagy alumínium mennyiséget a reverz ozmózis (RO) sem képes tökéletesen eltávolítani.

Ha a csapvíz alumínium tartalma alacsony volt, akkor a tisztítás hatékonyabbnak bizonyult. A tisztítás utolsó lépéseként alkalmazott reverz ozmózis az alumínium koncentrációját radikálisan csökkentette az aktív szenes szűrőből érkező vízben, így a tisztított víz alumínium tartalma minden esetben jóval a megengedett határérték alatt maradt.



14. ábra: a víz alumínium tartalmának változása a tisztítás különböző fázisaiban (koncentrációk µg/l-ben)

A művese állomás tisztító berendezésének és a víz vizsgálatának eredményei alapján jelentős eltéréseket tapasztaltam a tisztított víz alumínium tartalmában. Amennyiben a tisztításra kerülő vízben több volt az alumínium, úgy a reverz ozmózis a maradék alumínium kb. 60-65%-át távolította el, míg kisebb alumínium koncentráció mellett ez a hatásfok 80% fölött volt. Megállapítottam, hogy a tisztított víz alumínium tartalma függ ugyan a csapvíz alumínium tartalmától, de a hatékony tisztítási művelet után ez az érték minden esetben az egészségügyi határértékek alá csökkent. Úgy vélem, hogy a tisztító berendezésben az említett alumínium ötvözetből készült szelepek cseréjével, illetve az aktív szenes szűrő hatékonyságának növelésével (ill. alumínium koncentrációjának csökkentésével) a tisztított víz minősége valószínűleg tovább javítható.

### **5.4. Haj- és vérminták nyomelem összetételének vizsgálata**

A dialízis kezelés alatt álló betegek és az egészséges kontroll személyek vizsgált mintái között teljes vér, plazma, szérum és haj szerepelt. Annak eldöntésére, hogy a továbbiakban a nyomelem analitikai vizsgálatok során melyik mintát részesítsem előnyben (azaz mely minta a legjobb indikátora a vizsgált csoportok egészségi állapotának, ill. a közöttük levő különbségeknek), egy kísérletsorozatot végeztem 30 HD kezelés alatt álló beteg és 14 kontroll bevonásával. A betegektől és a kontrolloktól ugyanazon időben vér- plazma- és hajmintát gyűjtöttem, és a minták nyomelem tartalmát meghatároztam ICP-OES, ill. GFAAS módszerrel. Sor került szérum minták analízisére is, e vizsgálatok eredményeivel részletesen az 5.5. fejezetben foglalkozom.

A vér- plazma- és hajminták esetében megvizsgáltam azt, hogy a kontroll személyek és HD betegek mintáiból meghatározott elemkoncentrációk mennyire egyeznek, ill. térnek el az irodalomban szereplő adatoktól, és hogy kimutatható-e valamilyen különbség a betegek és a kontrollok között a vizsgált elemek esetében. Vizsgáltam továbbá, hogy van-e egyértelmű korreláció a különböző minták nyomelem koncentrációja között a két csoportnál. A vér, plazma és hajmintákban meghatározott elemkoncentrációkat a 22., 23. és 24. táblázatokban tüntettem fel.

A táblázatok adataiból látható, hogy az elemek többségénél az irodalomban szereplő referencia tartományok igen eltérőek lehetnek. Ennek fő oka, hogy az analitikai módszerek fejlődésével a szervezetben jelen levő kis nyomelem koncentrációk egyre pontosabb meghatározása vált lehetővé, és a határokat az újabb eredményeknek megfelelően mindig módosították. Ha az eredmények értékelése során nagy (akár nagyságrendi) eltéréseket tapasztaltam az egyes irodalmi referenciák, ill. a mért és az irodalmi értékek között, akkor a Fischbach-féle klinikai diagnosztikai értékeket [90] vettem figyelembe. A fejezet további részében először a saját kontroll eredményeket és az irodalmi referenciákat hasonlítom össze röviden, majd a fontosabb megfigyeléseket elemenként veszem sorra.

A saját kontroll minták eredményeit a klinikai gyakorlatban ma leginkább alkalmazott referenciákkal [90] összevetve megállapítottam, hogy az általam

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

meghatározott lokális referencia értékek általában összhangban vannak a nemzetközi referenciákkal. A fontosabb megállapítások az egyes mintákra a következők voltak:

- A *teljes vér minták* esetében a legfeltűnőbb a saját kontrollokból mért alacsony alumínium, kalcium, réz és cink koncentrációk voltak. A bór, vas és kálium koncentrációja a klinikai referenciáknak megfelelő volt. A magnézium koncentrációja az irodalmi tartomány alsó részére esett.
- A *plazma minták* elemkoncentrációi a teljes vérhez hasonlóak voltak, a cinkhiány itt már nem volt olyan jelentős.
- A kontroll *hajminták* alumínium koncentrációja a vérrel és plazmával ellentétben magasabb volt, mint a referencia érték. Ugyanakkor a bór és réz koncentrációja e mintában alacsonyabb volt, mint a referencia tartományok. A kálium és vas koncentrációjának átlaga a referencia tartományok alsó határán volt. Hajminták esetében a teljes vérből és a plazmából is mérhető cinkhiány nem volt kimutatható.

| Teljes vér (kontroll, mg/L) |                    |                    |                  |                  |                  |                |                  |                  |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
|                             | Al                 | B                  | Ca               | Cu               | Fe               | K              | Mg               | Zn               |
| max.                        | 0,024              | 1,08               | 68,15            | 1,19             | 560,2            | 1748           | 36,37            | 10,11            |
| min.                        | <0,0005            | < 0,02             | 12,86            | 0,21             | 255,1            | 901,45         | 10,06            | 1,70             |
| átlag                       | 0,01               | 0,37               | 40,51            | 0,52             | 354,3            | 1478           | 24,89            | 5,73             |
| <i>irod.[90]</i>            | <i>0,1-0,72</i>    | <i>0,04-0,7</i>    | <i>57,5-78,0</i> | <i>0,64-1,2</i>  | <i>301-530</i>   | <i>1600</i>    | <i>27,1-45,8</i> | <i>9,3-48,1</i>  |
| <i>irod.[88]</i>            | <i>0,002-0,008</i> | <i>0,02-0,05</i>   |                  | <i>0,8-1,1</i>   | <i>425-500</i>   |                |                  | <i>6-7</i>       |
| Plazma (kontroll, mg/L)     |                    |                    |                  |                  |                  |                |                  |                  |
|                             | Al                 | B                  | Ca               | Cu               | Fe               | K              | Mg               | Zn               |
| max.                        | 0,018              | 0,75               | 103,0            | 1,84             | 3,17             | 212,8          | 22,24            | 7,68             |
| min.                        | <0,0005            | < 0,02             | 37,99            | 0,22             | < 0,05           | 109,3          | 4,85             | < 0,01           |
| átlag                       | 0,009              | 0,09               | 74,02            | 0,77             | 1,25             | 157,9          | 14,69            | 2,04             |
| <i>irod.[90]</i>            | <i>0,28-0,41</i>   | <i>0,12</i>        | <i>89-106</i>    | <i>0,61-1,41</i> | <i>0,71-1,27</i> | <i>137-208</i> | <i>13-27,4</i>   | <i>0,79-1,70</i> |
| <i>irod.[88]</i>            | <i>0,001-0,005</i> | <i>0,015-0,045</i> |                  | <i>0,8-1,1</i>   | <i>0,8-1,2</i>   |                |                  | <i>0,8-1,1</i>   |

22. táblázat: kontroll személyek vér- és plazma vizsgálatainak eredményei (n=14)

Az **alumínium** nem tartozik az esszenciális nyomelemek közé, de felhasználásának jelentős mértékű növekedése, és a környezetkárosító tényezők (pl. savas esők)

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

hatására megnövekedett mobilitása miatt egyre komolyabb alumínium expozíció éri az embereket. Ezért fontos az alumínium élettani hatásainak és az emberi szervezetben mérhető koncentrációjának vizsgálata. A vérkeringésbe bekerülő alumínium súlyos klinikai tüneteket okoz: emlékezés, beszéd és motoros funkciók zavara, mentális leépülés, csontlágylás, stb. Rendszeres HD kezelésben részesülő betegek esetében mind a vér, mind a plazma nyomelem koncentrációja szélesebb tartományban mozgott, és több volt a referencia tartományt meghaladó érték. Ennek megfelelően az átlagértékek a kontrollokhoz és a referenciához képest is nagyobbak voltak. A hajminták alumínium koncentrációja hasonló eltéréseket mutatott, bár mindkét csoportban voltak a referencia tartományt meghaladó értékek. Az átlagkoncentráció a betegeknél volt a nagyobb. Az alumínium esetében bár voltak kisebb különbségek a két csoport különböző mintáinak átlaga között, ezek nem voltak jelentősek sem vér, sem plazma, sem pedig haj esetében. Nem találtam szoros összefüggést a különböző minták alumínium tartalmának alakulása között sem.

| Teljes vér (HD beteg, mg/L) |                    |                    |                  |                  |                  |                |                  |                  |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
|                             | Al                 | B                  | Ca               | Cu               | Fe               | K              | Mg               | Zn               |
| max.                        | 0,033              | 0,67               | 84,59            | 1,42             | 405,6            | 1772           | 44,60            | 13,62            |
| min.                        | < 0,0005           | 0,02               | 15,00            | < 0,04           | 100,6            | 928,5          | 13,74            | < 0,01           |
| átlag                       | 0,020              | 0,28               | 41,26            | 0,64             | 284,5            | 1276           | 30,86            | 3,89             |
| <i>irod. [90]</i>           | <i>0,1-0,72</i>    | <i>0,04-0,7</i>    | <i>57,5-78,0</i> | <i>0,64-1,2</i>  | <i>301-530</i>   | <i>1600</i>    | <i>27,1-45,8</i> | <i>9,3-48,1</i>  |
| <i>irod. [88]</i>           | <i>0,002-0,008</i> | <i>0,02-0,05</i>   |                  | <i>0,8-1,1</i>   | <i>425-500</i>   |                |                  | <i>6-7</i>       |
| Plazma (HD beteg, mg/L)     |                    |                    |                  |                  |                  |                |                  |                  |
|                             | Al                 | B                  | Ca               | Cu               | Fe               | K              | Mg               | Zn               |
| max.                        | 0,038              | 0,35               | 118,8            | 1,48             | 3,15             | 284,6          | 30,8             | 7,70             |
| min.                        | < 0,0005           | < 0,02             | 24,85            | < 0,04           | < 0,05           | 79,77          | 4,78             | < 0,01           |
| átlag                       | 0,009              | 0,08               | 59,09            | 0,89             | 0,90             | 205,5          | 18,55            | 2,33             |
| <i>irod. [90]</i>           | <i>0,28-0,41</i>   | <i>0,12</i>        | <i>89-106</i>    | <i>0,61-1,41</i> | <i>0,71-1,27</i> | <i>137-208</i> | <i>13-27,4</i>   | <i>0,79-1,70</i> |
| <i>irod. [88]</i>           | <i>0,001-0,005</i> | <i>0,015-0,045</i> |                  | <i>0,8-1,1</i>   | <i>0,8-1,2</i>   |                |                  | <i>0,8-1,1</i>   |

23. táblázat: HD betegek vér- és szérum vizsgálatának eredményei (n=30)

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A **bór** az eszenciális nyomelemek közé sorolható, fontos szerepe van a sejtosztódásban és a sejtnövekedésben. Koncentrációjának átlaga az egészséges kontrollok vérében és plazma mintáiban jelentősen eltér. A betegeknél vérben és plazmában mért koncentrációk kisebbek voltak, mint a kontrolloknál. Betegek esetében a bór koncentrációja szűkebb tartományban ingadozott, mint a kontrolloknál, koncentrációjának átlaga pedig a kontrollokhoz képest kisebbnek adódott mind vérben (beteg 0,28 mg/L , kontroll 0,37 mg/L), mind pedig a plazma mintákban (beteg 0,08 mg/L , kontroll 0,09 mg/L). A hajmintákban ezzel ellentétben a betegeknél mértem nagyobb, míg kontrolloknál kisebb bór koncentrációkat.

A **kalcium** létfontosságú elem, fontos szerepet játszik ioncsere-folyamatokban, a növekedésben és a csontképzésben. Hiánya növekedési zavarokat, csontlágylást okozhat. HD betegek esetében teljes vérből a kontrollokhoz hasonló átlagértéket mértem (beteg 41,26 mg/L , kontroll 40,51 mg/L), a plazma eredmények azonban a kontrolloknál is jóval kisebbnek bizonyultak (beteg 59,09 mg/L , kontroll 74,02 mg/L).

| Kontroll (mg/kg)             |                |            |                 |              |               |                |               |                |
|------------------------------|----------------|------------|-----------------|--------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
|                              | Al             | B          | Ca              | Cu           | Fe            | K              | Mg            | Zn             |
| max.                         | 14,28          | 1,75       | 2605            | 11,18        | 15,76         | 368,1          | 211,8         | 418,0          |
| min.                         | 1,38           | < 0,02     | 387,8           | 4,0          | 3,08          | 19,2           | 16,65         | 70,4           |
| átlag                        | 4,90           | 0,20       | 883,6           | 6,64         | 6,94          | 151,3          | 66,90         | 179,8          |
| <i>irod.[90]</i>             | <i>4,2-4,6</i> | <i>5</i>   | <i>146-3190</i> | <i>11-34</i> | <i>5-44,7</i> | <i>150-663</i> | <i>19-163</i> | <i>99-450</i>  |
| <i>irod.[88]</i>             | <i>3-10</i>    | <i>1-2</i> |                 | <i>15-25</i> | <i>30-60</i>  |                |               | <i>150-250</i> |
| Haemodializált beteg (mg/kg) |                |            |                 |              |               |                |               |                |
|                              | Al             | B          | Ca              | Cu           | Fe            | K              | Mg            | Zn             |
| max.                         | 20,10          | 11,69      | 3766            | 12,66        | 20,27         | 1044           | 569,6         | 311,9          |
| min.                         | < 0,0005       | < 0,02     | 115,6           | 1,52         | < 0,05        | 9,63           | 8,58          | 55,3           |
| átlag                        | 6,18           | 1,75       | 589,4           | 5,48         | 6,32          | 259,9          | 104,1         | 152,3          |

24. táblázat: a kontroll és HD beteg hajvizsgálatok eredményei (n=14, ill. 30)

A hajmintákból mért kalcium koncentrációk mind a kontrollok, mind pedig a betegek esetében meglehetősen széles tartományban mozogtak. Az általam meghatározott kontroll átlagértékhez képest a betegek átlag kalcium koncentrációja jelentősen kisebbnek bizonyult (beteg 589 mg/kg , kontroll 884 mg/kg).

A **réz** fontos szerepet játszik a hemoglobin szintézisben, a vörösvértestek kialakításában, a csontképzésben, és a neurotranszmitter szintézisben is. Koncentráció tartománya mindkét hivatkozott referenciában hasonló, és a teljes vér és plazma között sincs jelentős különbség. A kontroll eredményekhez képest a HD betegeknél mind a vérminták, mind a plazmaminták réz koncentrációját nagyobbak mértem (beteg vér 0,64 mg/L , kontroll 0,52 mg/L; beteg plazma 0,89 mg/L , kontroll 0,77 mg/L). Ezen eredmények közül a plazmában mért érték már megfelel az irodalmi referencia tartománynak. Hasonló tendenciát tapasztaltam a hajminták eredményeinél is. Mindkét csoport hajának réztartalma a referencia tartományok alsó határa alatt volt (kontroll 6,64 mg/kg, beteg 5,48 mg/kg, kontroll 11-34 mg/kg, ill. 15-25 mg/kg), a betegek hajában a rézkoncentráció nagyobb, mint a kontroll személyekében.

A **vas** legfontosabb biológiai szerepe a szervezetben az oxigén szállításában, ill. rövid távú tárolásában van. A teljes vér és a plazma vastartalmának jelentős eltérését az okozza, hogy a vérben a vas túlnyomórészt a hemoglobinhoz kötve fordul elő, mely azonban a plazmában nem található meg. A betegek vérében és plazmájában a vas koncentrációja mind az egészséges kontrollokhoz, mind pedig a referencia tartományokhoz képest jelentősen, mintegy 20-25 %-kal kisebbnek adódott (vérben 285 mg/L, plazmában 0,90 mg/L). A vérből és plazmából tapasztalt különbség hajminták esetében is hasonló tendenciát mutatott. A hajminták mérési eredményei vasra szélesebb tartományban ingadoztak a betegeknél, a kontroll vas eredmények (6,94 mg/kg) és a betegek eredményeinek átlaga (6,32 mg/kg) között csak mintegy 10 %-os különbséget tapasztaltam a kontrollok javára.

A **kálium** jelen van a különféle szövetekben és testfolyadékokban, szerepet játszik a ioncsere folyamatokban és az ingerület átvitelben. A HD kezelés alatt álló betegek esetében vérmintákból kisebb kálium koncentrációt mértem, mint a kontrollok esetében (kontroll 1478 mg/L , beteg 1276 mg/L). Ezzel szemben a plazma mintákból meghatározott koncentráció a betegeknél nagyobb volt, mint a

kontrolloknál, és az átlagérték (206 mg/L) a referencia tartomány felső határához volt közel. A hajminták kálium tartalmában sokkal jelentősebb különbséget találtam a kontrollok és a betegek között. Míg a kontrollok hajában a kálium koncentrációja 151 mg/kg volt, addig a HD betegek mintáiban ennél jóval nagyobb koncentrációt, 260 mg/kg-ot mértem.

A **magnézium** szerepét főleg sav-bázis katalizátorok aktív centrumaként tölti be az élő szervezetben. A HD betegek mintáiban a kontrollokhoz viszonyítva nagyobb magnézium koncentrációt találtam, melyek jól illeszkedtek a referencia tartományok középső szakaszába (kontroll vér 24,89 mg/L , beteg 30,86 mg/L; kontroll plazma 14,69 mg/L , beteg 18,55 mg/L). Hasonló tendenciát figyeltem meg a hajmintákból is. A kontroll személyek és a betegek hajának magnézium koncentrációja egyaránt megfelelt a referencia tartománynak, de a betegek mintáiban közel 40 %-kal nagyobb magnézium koncentrációt találtam (kontroll 66,90 mg/kg , beteg 104 mg/kg, referencia tartomány 19-163 mg/kg).

A **cink** a nukleinsav szintézis, a proteinszintézis és a sejtosztódás folyamatában szereplő esszenciális nyomelem. A kontrollok vérében mért átlagérték mindkét referenciához képest alacsonynak bizonyult (kontroll 5,73 mg/L , referencia 9,3-48,1 mg/L, ill. 6-7 mg/L), míg a plazmából mért eredmények nagyobbak voltak a referencia tartomány felső határánál (kontroll plazma 2,04 mg/L , referencia 0,79-1,70 mg/L, ill. 0,8-1,1 mg/L). Betegek esetében a vérből mintegy 30 %-kal alacsonyabb cink koncentrációt mértem, mint a kontrollok mintáiból (3,89 mg/L), míg a plazma mintákban ezzel ellentétben a kontrolloknál magasabb cink tartalmat mértem (2,33 mg/L). A hajminták vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy a kontrolloknál mért átlagos cink koncentráció kb. 15 %-kal nagyobb, mint a betegeknél mért érték (kontroll 180 mg/kg , beteg 152,3 mg/kg).

A fenti eredményekből látható, hogy bár a vizsgált elemek nagy részénél különbség tapasztalható a különböző mintákból meghatározott átlagértékek között az egészséges kontroll személyek és a HD kezelés alatt álló betegek között, ezek a különbségek a nagy biológiai szórás miatt nem mindig egyértelműek. Nem sikerült egyértelműen bebizonyítani azt sem, hogy a vizsgált elemek koncentrációja a különböző mintákban (különös tekintettel a haj és a vér, ill. a haj és a plazma közötti korrelációra) azonos módon változik.

Mivel a klinikai gyakorlatban a legelterjedtebben szérumot, illetve plazmát használnak az analitikai vizsgálatok elvégzésére, e mintákhoz elfogadott klinikai referencia tartományok léteznek. A hajról ugyanez nem mondható el; az irodalomban közölt adatok a normális, egészséges elemkoncentrációkra nagyon eltérőek, és nem áll rendelkezésre a klinikai gyakorlatban elfogadott, széles körben használható referencia táblázat.

A fentiek miatt ezért a további vizsgálatokhoz plazmát, ill. szérumot használtam. A két minta elemösszetétele hasonló, azonban az utóbbi szervesanyag tartalma jelentősen kisebb, így a szérum használata volt a legcélszerűbb, különösen a roncsolás nélkül végzett hígítós mintaelőkészítés és az alumínium GFAAS módszerrel történő mérése során.

Az egészséges emberek szérum mintáiban saját környezetünkben (Debrecen és környéke) a nyomelemek mennyiségére vonatkozóan korábbi, korszerű analitikai módszerrel meghatározott referencia értékek nem ismertek. Mivel a nyomelem összetételt a helyi környezeti hatások (ipari tevékenység, a talaj és víz összetétele), táplálkozási szokások, stb. befolyásolják, így az általam fiatal, egészséges kontrollok mintáiban mért koncentráció értékek lokális referenciaként szerepelhetnek a további kutatások során.

### **5.5. Kontroll személyek és hemodialízis kezelésben részesülő betegek szérumának vizsgálata**

A fejezetben szereplő statisztikai kiértékelésekhez a Chi-square módszert és a Student T-tesztet használtam [103].

#### **5.5.1. Referencia tartományok megállapítása a vizsgált nyomelemekre**

Az eredmények kiértékeléséhez szükséges klinikai referencia tartományok, melyek meghatározása nemzetközi eredmények alapján történt, a korábban tárgyalt okok miatt jelentősen eltérhetnek az adott területen élő populációnál egészséges egyéneknél mérhető értékektől. A vizsgálatokat mind a kontrollok, mind a betegek esetében szérum mintákból végeztem. Választásom az 5.4. fejezetben tárgyalt okok miatt esett e mintára.

A vizsgálatok során az egészséges kontrolloktól gyűjtött mintákat (n=19, életkor: 22±4,5 év) mikrohullámú készülékben, ill. TMAH oldattal roncsoltam el, és az elemkoncentrációkat ICP-MS és GFAAS módszerrel határoztam meg.

Az elemkoncentrációk visszanyerésének megbízhatóságát megfelelő referencia minta hiányában nagyobb mennyiségű szérum mintával tanulmányoztam. A minta 10 párhuzamos részletéhez roncsolás előtt multielemes standard oldatot adtam olyan mennyiségben, hogy a minták elemkoncentrációjának növekedése 1 µg/L, ill. 10 µg/L legyen. A kísérlet eredményei a 25. táblázatban láthatók.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

| Koncentráció növekedés a <i>hozzáadott mennyiség</i> függvényében |           |            |
|---|-----------|------------|
| Elemek  | 1 µg/L    | 10 µg/L    |
| Al  | 1,05±0.09 | 10.24±0.20 |
| Cr  | 1.00±0.05 | 10.09±0.15 |
| Mn  | 0.99±0.04 | 10.19±0.29 |
| Fe  | 2.19±1.23 | 11.17±0.43 |
| Co  | 1.00±0.03 | 10.26±0.25 |
| Ni  | 1.00±0.04 | 10.18±0.13 |
| Cu  | 0.95±0.02 | 10.05±0.13 |
| Zn  | 1.04±0.03 | 10.17±0.16 |
| Sr  | 1.05±0.06 | 10.45±0.44 |
| Mo  | 1.01±0.03 | 10.22±0.24 |
| Cd  | 1.01±0.03 | 10.07±0.23 |
| Pb  | 0.99±0.03 | 10.11±0.30 |

25. táblázat: a szérum visszanyerési tesztek eredményei (n=10)

A visszanyerések általában igen jól egyeztek a mintákhoz adott nyomelem mennyiségekkel. A vasnál tapasztalt magas visszanyerések oka a molekulaionoktól származó jelentős interferencia (pl.  $\text{Ar}^{14}\text{N}^+$ ,  $\text{Ar}^{16}\text{OH}^+$ ).

A kontroll személyek szérumában mért elemkoncentrációkat a 26. táblázatban tüntettem fel, néhány irodalmi tartománnyal összevetve. A kontrollok adatainál szerepel a mért koncentráció tartomány és az arra meghatározott átlagérték is, melynek szórása nem a módszer szórását jelenti, hanem a biológiai különbségek miatt tapasztalható nagy eltérésekre utal.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

| Elemek | Iyengar [89] | Fischbach [90] | WHO [88] | Mért tartomány | Mért átlag |
|--------|--------------|----------------|----------|----------------|------------|
| Al     | 110-780      | 4              | 1-5      | < 0.95         | < 0.95     |
| Cr     | 2-20         | 14             | 0.1-0.2  | 42.8-59.3      | 51.8±10.1  |
| Mn     | 0.54-61      | 4-11.4         | 0.5-1    | 2.27-5.05      | 3.9±1.3    |
| Fe     | 870-1870     | 500-1600       | 800-1200 | 1282-2050      | 1465±287   |
| Co     | 0.2-62       | 1.2-2          | 0.1-0.3  | 0.22-0.88      | 0.57±0.32  |
| Ni     | 7.8-58       | 26             | 1-2      | 0.03-16.3      | 2.35±2.21  |
| Cu     | 970-1640     | 700-1400       | 800-1100 | 691-1003       | 802±98     |
| Zn     | 670-1830     | 550-1500       | 800-1100 | 591-1217       | 843±300    |
| Sr     | < 46         | --             | --       | 30.4-47.4      | 34.8±5.6   |
| Mo     | 6-27         | 5-30           | 0.1-0.5  | 0.73-1.19      | 0.91±0.19  |
| Cd     | 2.3-12       | 1-5            | 0.1-0.3  | 0.02-0.62      | 0.30±0.25  |
| Pb     | 16-130       | < 100          | < 1      | 0.02-2.70      | 0.84±0.54  |

26. táblázat: a kontroll szérum mérési eredmények és a referencia értékek összehasonlítása (n=19, koncentrációk µg/L-ben, a referencia értékek felnőtt férfiakra vonatkoznak)

A megadott referencia tartományok közül a legrégebbi az Iyengar és munkatársai által összeállított volt, melynek adatai sok esetben jelentősen eltérnek a napjainkban használatos egészséges referencia tartományoktól (pl. alumínium, kobalt, mangán, nikkel, réz, cink esetében). Ezért a kiértékeléshez a továbbiakban is a klinikai gyakorlatban használt, Fischbach által összegyűjtött adatokat, ill. a WHO 1996-os ajánlását használtam.

A kontrollok esetében az alumínium koncentrációja a normál tartományba esett, a WHO által megadott alsó határ közelében volt (mért 0,95 µg/L, WHO 1-5 µg/L, Fischbach 4 µg/L). A mangánra megadott referencia értékek igen eltérőek, 4-11,4 µg/L és 0,5-1 µg/L értékek is szerepelnek. Az általam meghatározott 3,9±1,3 µg/L érték az egyik esetben a referencia tartomány alsó határán van, míg a WHO

ajánlásánál ez az érték jóval magasabb. A kontrollok egy részénél a mangán koncentrációja a kimutatási határ alatt volt ( $0,06 \mu\text{g/L}$ ). A vas koncentrációja a kontrollok szérumban nők és férfiak esetében is a normál tartományban volt (férfi:  $500\text{-}1600 \mu\text{g/L}$ , nő:  $400\text{-}1500 \mu\text{g/L}$ ), néhány extrém eltérő adat kivételével, melyek a minta hemolízise miatt a referencia tartománynál magasabbnak adódtak. A kobaltnál a mangánhoz hasonlóan az irodalmi tartományok széles határok között változnak ( $1,2\text{-}2 \mu\text{g/L}$ , ill.  $0,1\text{-}0,3 \mu\text{g/L}$ ), ennek megfelelően a kontrollokban mért értékeket ( $0,22\text{-}0,88 \mu\text{g/L}$ ) a referencia tartománynak megfelelőnek tekintettem. A nikkal esetében a referenciák között nagyságrendi különbség van ( $26 \mu\text{g/L}$ , ill.  $1\text{-}2 \mu\text{g/L}$ ), az általam meghatározott értékek túlnyomó része a WHO ajánlásában szereplő értékhez közeli ( $2,35 \pm 2,21 \mu\text{g/L}$ ). A réz koncentrációja ( $802 \pm 98 \mu\text{g/L}$ ) az irodalmi tartományok alsó határán, illetve kevéssel az alatt mozgott a kontroll szérumban. A cink koncentrációja széles határok között változott a kontroll mintákban ( $591\text{-}1217 \mu\text{g/L}$ ), lefedve a teljes referencia tartományt ( $550\text{-}1500 \mu\text{g/L}$ , ill.  $800\text{-}1100 \mu\text{g/L}$ ). A stroncium koncentrációja, melynek meghatározása nukleáris balesetek hatásának felderítésében lehet igen fontos, az irodalomban talált egyetlen referencia értéknek megfelelő volt (mért:  $30,4\text{-}47,4 \mu\text{g/L}$ , referencia  $< 46 \mu\text{g/L}$ ). Figyelembe véve az irodalmi adatok közötti nagy különbségeket ( $5\text{-}30 \mu\text{g/L}$ , ill.  $0,1\text{-}0,5 \mu\text{g/L}$ ), a molibdén koncentrációját a kontroll szérumban megfelelőnek tekintettem ( $0,73\text{-}1,19 \mu\text{g/L}$ ). Hasonló tapasztalataim voltak a kadmiummal kapcsolatban is: a referencia értékekben (mely a toxikus nehézfémek esetében, mint például a kadmium és az ólom, a megengedett koncentráció tartomány felső határát jelentik) nagyságrendi eltérést tapasztaltam ( $1\text{-}5 \mu\text{g/L}$ , ill.  $0,1\text{-}0,3 \mu\text{g/L}$ ), a mért kontroll értékek ezek közül leginkább a WHO ajánlásának feleltek meg ( $0,02\text{-}0,62 \mu\text{g/L}$ ). Az ólom esetében is jelentős a különbség a megadott határértékek között ( $< 100 \mu\text{g/L}$ , ill.  $< 1 \mu\text{g/L}$ ). Az általam mért értékek megfelelték mindkét határértéknek, de ebben az esetben is a WHO ajánlásához voltak közelebb ( $0,02\text{-}2,70 \mu\text{g/L}$ ). Az egyetlen elem a króm volt, melynél az irodalmi tartományok és a mért értékek között nagyon jelentős eltérés adódott. A króm koncentrációja az irodalmi ajánlásokban nagyságrendileg is különbözik ( $14 \mu\text{g/L}$ , ill.  $0,1\text{-}0,2 \mu\text{g/L}$ ), de az általam mért értékek még a magasabb irodalmi határértéket is többszörösen meghaladják ( $42,8\text{-}59,3 \mu\text{g/L}$ ). Ennek oka valószínűleg

az, hogy a vérvétel során alkalmazott rozsdamentes acél vérvételi tű a levett vért krómmal szennyezi, mialatt az áthalad a tű belsejében. Ennek kiküszöbölésére az irodalomban teflon bevonatú vérvételi tűt, vagy műanyag kanült javasolnak a szerzők [15], de ezek alkalmazása munkám során nem állt módomban.

### 5.5.2. Hemodializált betegek szérumának nyomelem összetétele

A rendszeres hemodialízis kezelés alatt álló betegek szérumának analitikai vizsgálata a kontroll mintákkal egyező módon történt. Vizsgálataim során 65 betegről származó mintát analizáltam (életkor:  $58 \pm 7$  év).

A betegek szérum elemzésének eredményeit a kontroll mérésekkel összehasonlítva a 27. táblázatban mutatom be.

| Elemek | Hemodializált beteg<br>[ $\mu\text{g/L}$ ] | Kontroll [ $\mu\text{g/L}$ ] |
|--------|--|------------------------------|
| Al     | $6,01 \pm 5,04$                            | $< 0,95$                     |
| Cr     | $63,2 \pm 11,4$                            | $51,8 \pm 10,1$ **           |
| Mn     | $1,15 \pm 1,12$                            | $3,9 \pm 1,3$ **             |
| Fe     | $1036 \pm 393$                             | $1465 \pm 287$ **            |
| Co     | $0,99 \pm 0,96$                            | $0,57 \pm 0,32$ *            |
| Ni     | $11,42 \pm 10,5$                           | $2,35 \pm 2,21$ **           |
| Cu     | $1205 \pm 316$                             | $802 \pm 98$ **              |
| Zn     | $875 \pm 446$                              | $843 \pm 300$                |
| Sr     | $215 \pm 54$                               | $34,8 \pm 5,57$ ***          |
| Mo     | $6,55 \pm 2,91$                            | $0,91 \pm 0,19$ ***          |
| Cd     | $0,44 \pm 0,36$                            | $0,30 \pm 0,25$              |
| Pb     | $0,80 \pm 0,77$                            | $0,84 \pm 0,54$              |

27. táblázat: a hemodializált betegek és a kontrollok szérumának elemkoncentrációja  
(\*:  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\*:  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )

A táblázat adataiból látható, hogy jelentős különbségeket találtam a betegek és a kontrollok szérumának elemösszetétele között a legtöbb elem esetében. Az alumínium koncentrációja a betegek szérumában az egészséges határérték körül ingadozott, volt azonban néhány kiugróan magas érték. A betegeknek az alumínium koncentrációja közel hatszoros volt a kontrollokhoz képest (beteg  $6,01 \pm 5,04 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $< 0,95 \mu\text{g/L}$ ). A króm koncentrációja a kontrolloknál megfigyelt szennyeződés ellenére is különbözött a két csoportnál. A dializált betegeknek a kontrollokhoz képest nagyobb króm koncentrációt tapasztaltam (beteg  $63,2 \pm 11,4 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $51,8 \pm 10,1 \mu\text{g/L}$ ). A betegek szérumának mangán koncentrációja alacsonyabb volt, mint a kontrolloké (beteg  $1,15 \pm 1,12 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $3,9 \pm 1,3 \mu\text{g/L}$ ). A mangánhoz hasonlóan a vas koncentrációja is a betegeknek volt alacsonyabb (beteg  $1036 \pm 393 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $1465 \pm 287 \mu\text{g/L}$ ). Kobalt esetében a betegeknek magasabb koncentrációkat mértem ( $0,99 \pm 0,96 \mu\text{g/L}$ ) mint a kontrolloknál ( $0,57 \pm 0,32 \mu\text{g/L}$ ), de ez a különbség a betegeknek tapasztalt nagy egyéni ingadozások miatt nem volt egyértelmű. A nikkel koncentrációk széles tartományban ingadoztak a betegeknek ( $11,4 \pm 10,5 \mu\text{g/L}$ ) és a kontrolloknál ( $2,35 \pm 2,21 \mu\text{g/L}$ ) egyaránt, azonban a betegek szérumában a nikkel koncentrációja jóval magasabb volt, mint a kontrolloknál. A réz koncentrációja is a betegeknek volt magasabb a szérumban (beteg  $1205 \pm 316 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $802 \pm 98 \mu\text{g/L}$ ). A stroncium koncentrációja a betegek szérumában több, mint hatszorosa volt a kontrolloknál mért értékeknek (beteg  $215 \pm 54 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $34,8 \pm 5,6 \mu\text{g/L}$ ). E meglepően magas stroncium koncentrációkat nem tudtam megmagyarázni, és az orvosi irodalomban sem találtam a stroncium koncentrációjára vonatkozó megállapításokat. A molibdén koncentrációja a betegeknek kb. hatszorosa volt, mint a kontrolloknál (beteg  $6,55 \pm 2,91 \mu\text{g/L}$ , kontroll  $0,91 \pm 0,19 \mu\text{g/L}$ ). A kadmium esetében szintén a betegeknek mértem magasabb koncentrációkat, ez a különbség azonban nem volt egyértelmű. A cink és az ólom átlagkoncentrációja a két csoportban csak igen kis mértékben tért el.

A rendszeres HD kezelés alatt álló betegek esetében tanulmányoztam azt is, hogy az egyes elemek esetében a mért koncentrációk hány betegnek vannak az irodalmi referencia tartomány alatt, illetve fölött. Ezek az eredmények láthatók a 28. táblázatban. Az eredmények szerint az alumínium koncentráció 19 beteg

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

szérumában nagyobb volt 5 µg/L-nél, azonban a 10 µg/L-es értéket csak 2 esetben haladta meg. A króm (hasonlóan a kontrollokhoz) minden beteg esetében a normál tartomány felső határa fölött volt a mintavétel során történt szennyeződés miatt.

| Elem | mért minimum | mért maximum | A HD betegek száma a mért koncentrációk alapján (n=65) |                   |             | Minták száma a referencia tartományok alapján |       |            |       | <i>Chi</i> <sup>2</sup> |
|------|--------------|--------------|--|-------------------|-------------|---|-------|------------|-------|-------------------------|
|      | µg/L-ben     |              | ref. tart. alatt                                       | ref. tart. felett | extrém nagy | Betegek                                       |       | Kontrollok |       |                         |
|      |              |              |  |                   |             | Nem megf.                                     | Megf. | Nem megf.  | Megf. |                         |
| Al   | 1            | 28,9         | 0  | 19                | 2           | 21  | 44    | 0          | 22    | 9,369**                 |
| Cr   | 44,1         | 92,5         | 0  | 65                | 0           | 65  | 0     | 22         | 0     | --                      |
| Mn   | <0,005       | 6,36         | 26   | 0                 | 0           | 26  | 39    | 0          | 22    | 12,551***               |
| Fe   | 300          | 1995         | 12   | 11                | 1           | 24  | 41    | 7          | 15    | 0,186                   |
| Co   | <0,003       | 3,34         | 23   | 0                 | 1           | 24  | 41    | 0          | 22    | 11,217***               |
| Ni   | <0,023       | 81,62        | 6  | 3                 | 4           | 13  | 52    | 0          | 22    | 5,173*                  |
| Cu   | 802          | 2182         | 0  | 8                 | 1           | 9   | 56    | 0          | 22    | 3,397                   |
| Zn   | <0,120       | 2593         | 4  | 2                 | 1           | 7   | 58    | 0          | 22    | 2,576                   |
| Sr   | 136          | 466          | 0  | 17                | 48          | 65  | 0     | 0          | 22    | --                      |
| Mo   | 1,52         | 16,89        | 9  | 0                 | 3           | 12  | 53    | 3          | 19    | 0,268                   |
| Cd   | <0,002       | 12,81        | 34   | 1                 | 0           | 35  | 30    | 0          | 22    | 19,819***               |
| Pb   | <0,008       | 14,84        | 32   | 1                 | 1           | 2   | 63    | 0          | 22    | 0,693                   |

28. táblázat: a HD betegek és kontrollok számának alakulása a referencia tartományok szerint (extrém magas: a referencia tartomány felső határát legalább 50%-kal meghaladó)

(\*: 0,01 < p < 0,05; \*\*: 0,001 < p < 0,01; \*\*\*: p ≤ 0,001)

Az eszenciális nyomelemek közül a mangán 26 beteg szérumában nem volt jelen mérhető mennyiségben, a kobalt 23 beteg mintáiban ugyancsak kisebb volt, mint a referencia tartomány alsó határa. A nikkel koncentrációja 6 betegnél a referencia tartomány alatt volt, 3 betegnél e fölött alakult, és 4 olyan esetet találtam, ahol nagyon magas volt. A molibdén 9 esetben ugyancsak kisebb volt, mint a referencia tartomány alsó értéke. A vas esetében kb. ugyanannyi betegnél volt a koncentráció a referencia tartomány alsó határa alatt, mint fölött. Az ólom és a kadmium

koncentrációja a betegek szérumában többnyire igen alacsony volt, az ólom esetében mindössze egy betegnél mértem extrém magas értéket. Ahogy az átlagok alakulásából is látható volt, a betegek szérumának stroncium koncentrációja a fellelt egyetlen referencia értékhez képest nagyobbak, a betegek többségénél extrém nagyok bizonyult.

Míg a 27. táblázatban a betegeknél és kontrolloknál mért átlag koncentrációkat mutattam be, addig a 28. táblázat harmadik részében azt hasonlítottam össze, hogy hány betegnek ill. kontrollnak a szérumában mért nyomelem koncentráció van a klinikai referencia tartományban, ill. azon kívül. Látható, hogy az alumínium, mangán, kobalt, nikkel, stroncium és kadmium esetében szignifikáns különbség van a két csoport között. Míg a kontrollok mérési eredményei gyakorlatilag minden esetben a referencia tartományban voltak, addig a betegek eredményeinek jelentős része e tartományon kívül található.

Mivel a minták a mintavétel során valószínűleg krómmal szennyeződtek, ezért a króm mérési eredményeket a továbbiakban nem vettem figyelembe az értékelések során.

### 5.5.3. A dialízis kezelés hatása a szérum nyomelem koncentrációjára

A hemodialízis az urémiás betegek kezelésének az a módja, amely pótolja a kiesett vesefunkciókat. A veseelégtelenség háttérében számos patológias folyamat áll, ezt tovább bonyolítja, hogy maga a hemodialízis kezelés sem mentes a kockázatoktól. A krónikus vesebetegség esetén alkalmazott hemodialízis eltávolítja a szervezetben felhalmozott salakanyagokat (pl. a protein lebontás végtermékeit, mint a karbamid, kreatinin, stb.), azonban a nagyobb molekulású, elsősorban proteinhez kötött anyagok vagy éppen protein típusú vegyületek eltávolítása nem oldható meg. Ennek következménye lehet pl. a vesén keresztül ürülő, nagyobb molekulású proteinekhez kötött toxikus fémek felszaporodása, illetve a mobilis, vagy kisebb molekulákhoz kötött elemek kimosódása a dialízis kezelés során. A nyomelemstátusz megváltozásának másik forrása, hogy a veseelégtelenségben szenvedő betegek komoly étrendi megszorításokkal táplálkozhatnak (pl. redukált protein bevitel), és ennek következtében nem megfelelő a nyomelemekkel és vitaminokkal való ellátottságuk.

A nyomelem státusz változásának tanulmányozása szempontjából ezért fontos, hogy a vizsgáljuk a dialízis kezelés hatására bekövetkező nyomelem koncentráció változásokat. Mivel ilyen adatok jelenleg nem állnak rendelkezésre, vizsgálatokat végeztem egyrészt több betegnél egyetlen dialízis kezelés hatására bekövetkező változások megállapítására, másrészt a dialízis során a dialízis idő függvényében lejátszódó változások követésére is.

#### **5.5.3.1. A szérum minták nyomelem összetételének eltérései a dialízis kezelés előtt és után**

Ugyanazon betegtől dialízis előtt és dialízis után (az ioncsere egyensúlyok, valamint az extracelluláris és intracelluláris tér közötti egyensúly beállítását követően) vett minták nyomelem koncentrációját meghatározva vizsgáltam, hogy egyetlen dialízis kezelés milyen hatással van az egyes nyomelemek koncentrációjára a betegek szérumában. A dialízis előtt és dialízis után mért koncentrációk átlagai a 29. táblázatban láthatók.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

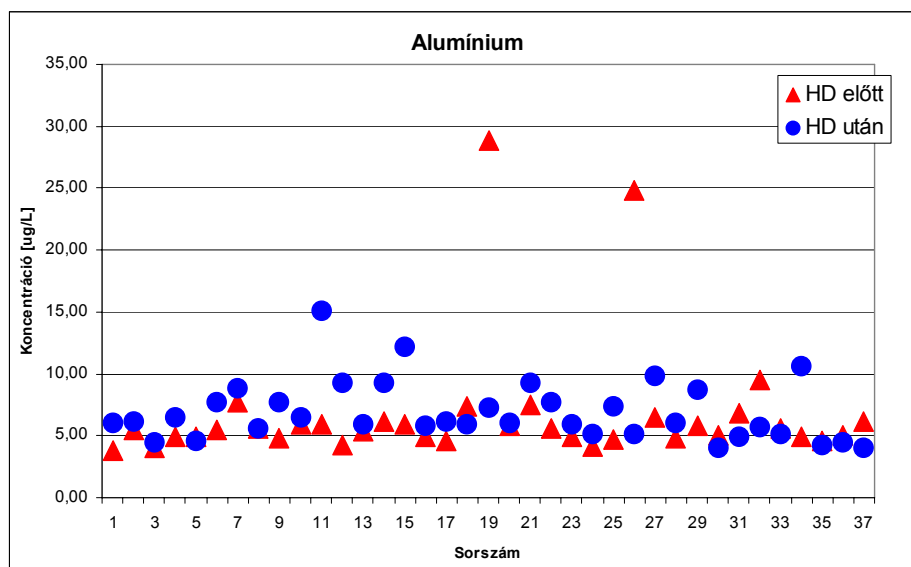
| Elem | Hemodialízis előtt [ $\mu\text{g/L}$ ] | Hemodialízis után [ $\mu\text{g/L}$ ] |
|------|--|---------------------------------------|
| Al   | 6,72 $\pm$ 2,46                        | 6,83 $\pm$ 1,80                       |
| Mn   | 0,91 $\pm$ 1,16                        | 3,41 $\pm$ 1,98                       |
| Fe   | 1021 $\pm$ 353                         | 1031 $\pm$ 613                        |
| Co   | 1,08 $\pm$ 0,88                        | 1,16 $\pm$ 0,68                       |
| Ni   | 13,3 $\pm$ 12,1                        | 13,3 $\pm$ 8,3                        |
| Cu   | 1225 $\pm$ 260                         | 1318 $\pm$ 275                        |
| Zn   | 898 $\pm$ 312                          | 798 $\pm$ 380                         |
| Sr   | 227 $\pm$ 33                           | 263 $\pm$ 20                          |
| Mo   | 6,80 $\pm$ 2,16                        | 2,85 $\pm$ 0,94                       |
| Cd   | 0,54 $\pm$ 0,79                        | 0,42 $\pm$ 0,38                       |
| Pb   | 0,93 $\pm$ 1,47                        | 1,04 $\pm$ 0,69                       |

29. táblázat: az egyszeri dialízis kezelés közvetlen hatása a betegek szérumának átlagos nyomelem koncentrációjára

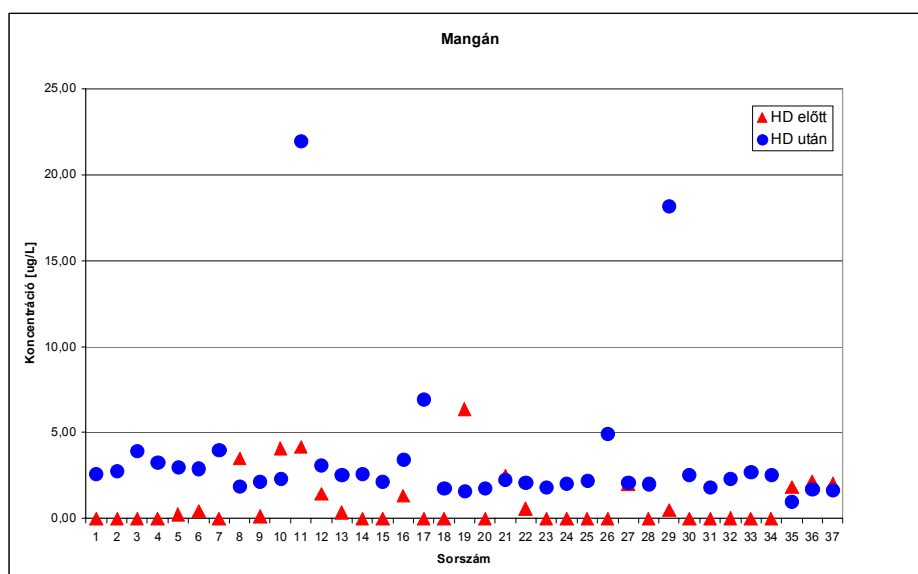
A táblázat adataiból látható, hogy figyelembe véve az egyének közötti szórások nagyságát, az alumínium, vas, kobalt, nikkell és réz átlagkoncentrációja nem változott jelentősen a dialízis kezelés hatására. Cink és kadmium esetében kis mértékű csökkenés történt a dialízis kezelés hatására. A koncentráció csökkenés jelentősebb (kb. 50 %-os) volt molibdénnél. A dialízis kezelés hatására megnőtt a szérumban a stroncium, ólom és mangán koncentrációja. Ez utóbbinál a növekedés jelentős.

Az átlagértékek összehasonlítása a nagy egyéni eltérések miatt nem minden elem esetén ad szignifikáns eltérést, ezért a dialízis előtti és utáni koncentrációkat betegenként is érdemes összehasonlítani. Ezek az adatok láthatók a 15-25. ábrákon.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

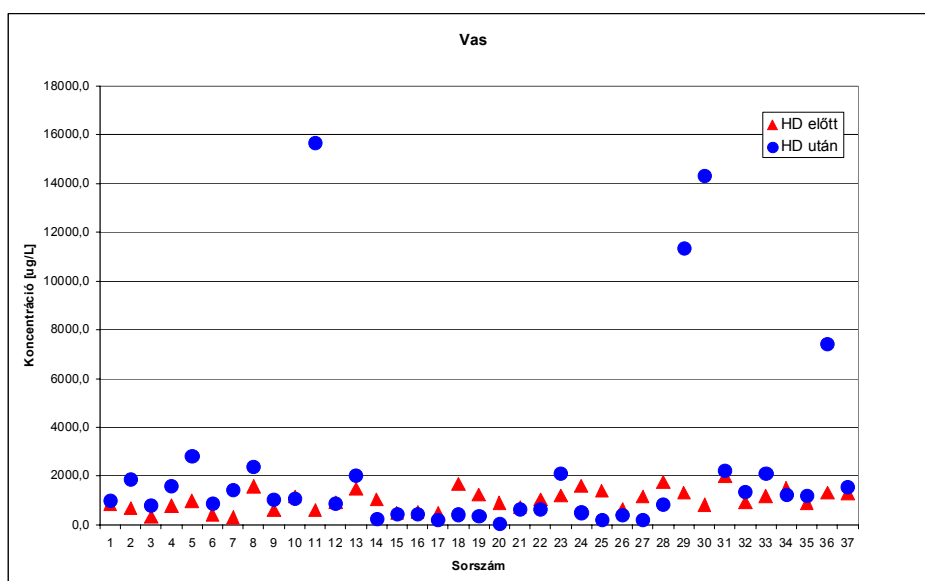


15. ábra: az alumínium koncentrációjának változása a dialízis hatására

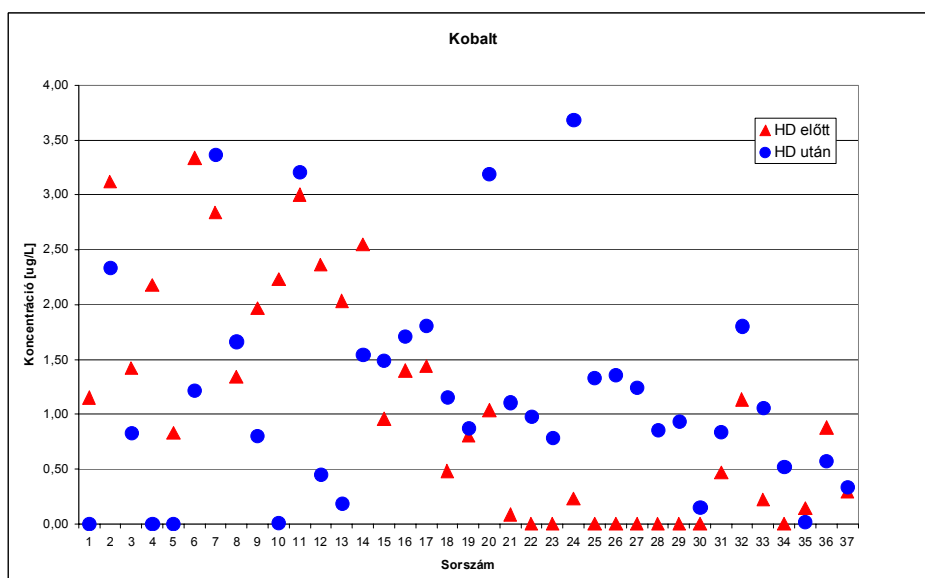


16. ábra: a mangán koncentrációjának változása a dialízis kezelés során

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

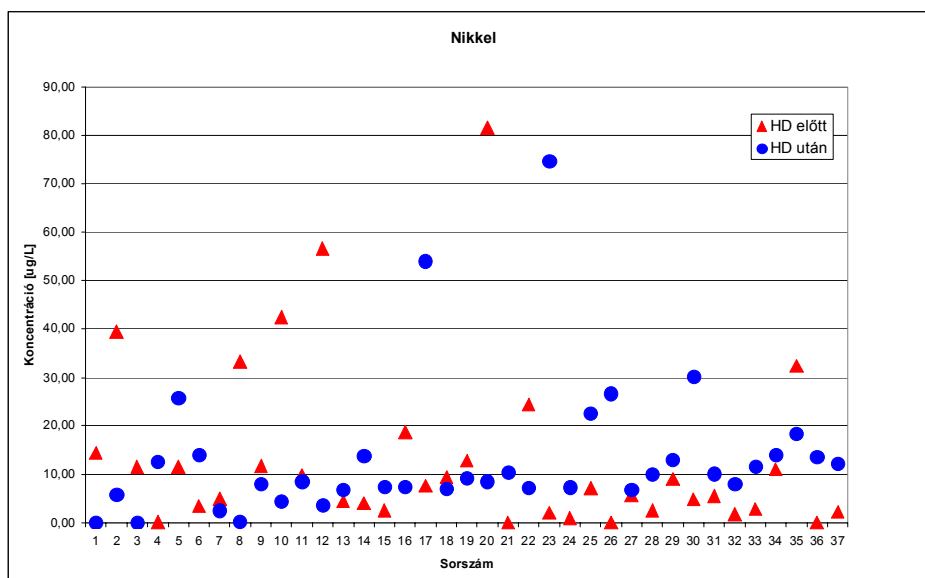


17. ábra: a vas koncentrációjának változása a dialízis kezelés hatására

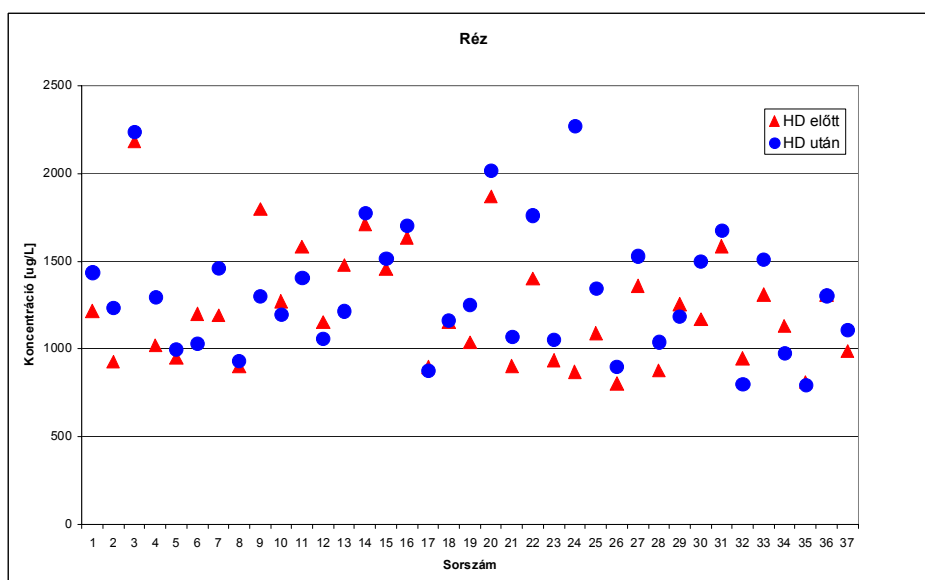


18. ábra: a kobalt koncentrációjának változása a dialízis során

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

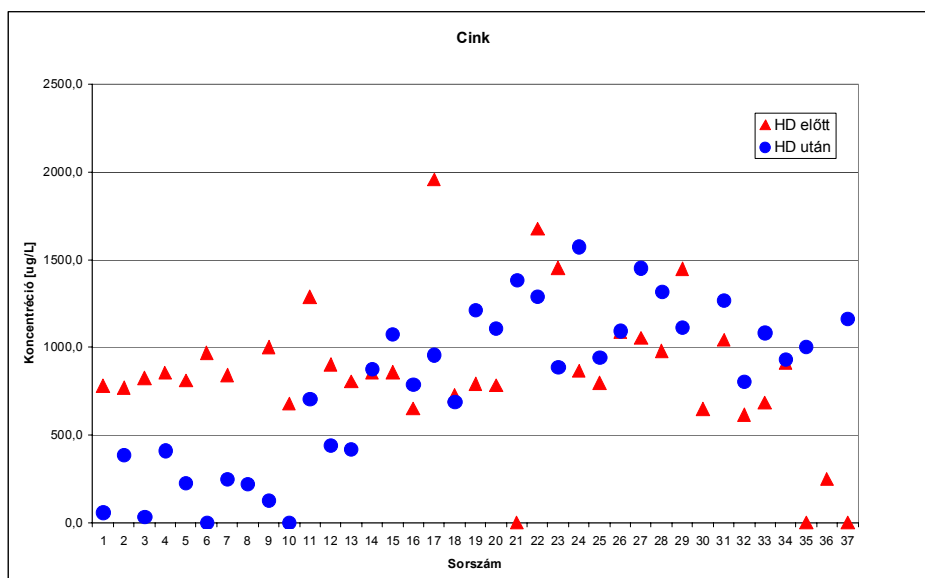


19. ábra: a nikkel koncentrációjának változása a dialízis hatására

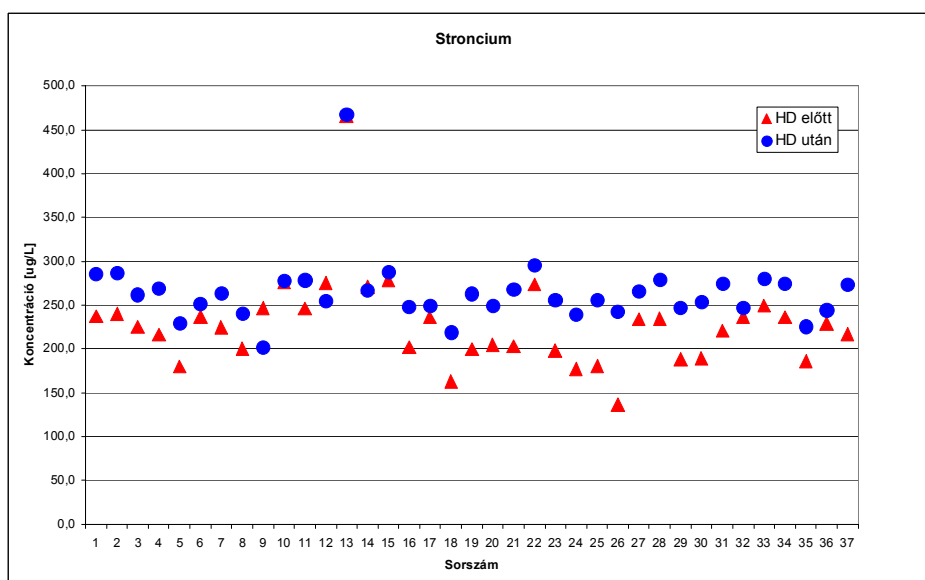


20. ábra: a réz koncentrációjának változása a dialízis hatására

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

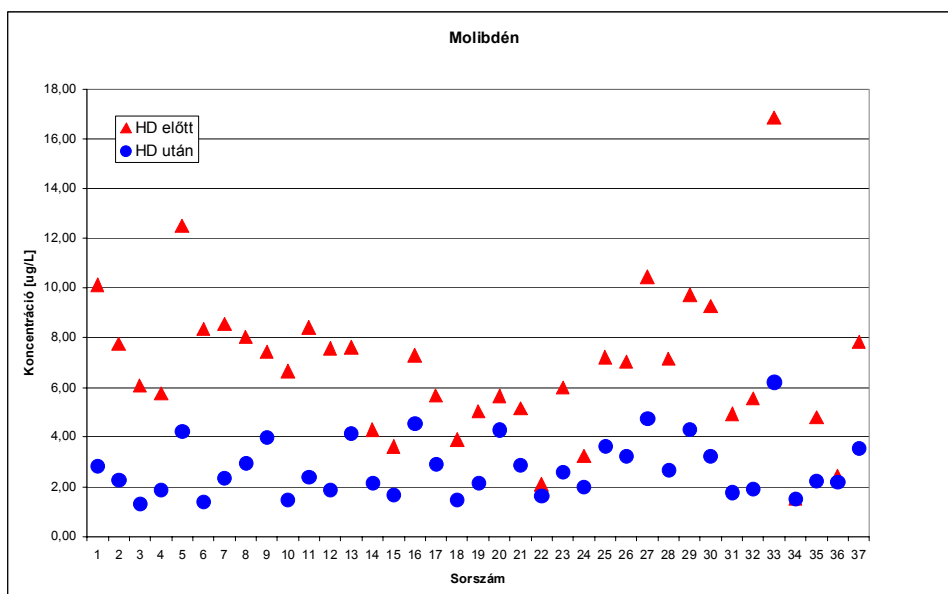


21. ábra: a cink koncentrációjának változása a dialízis hatására

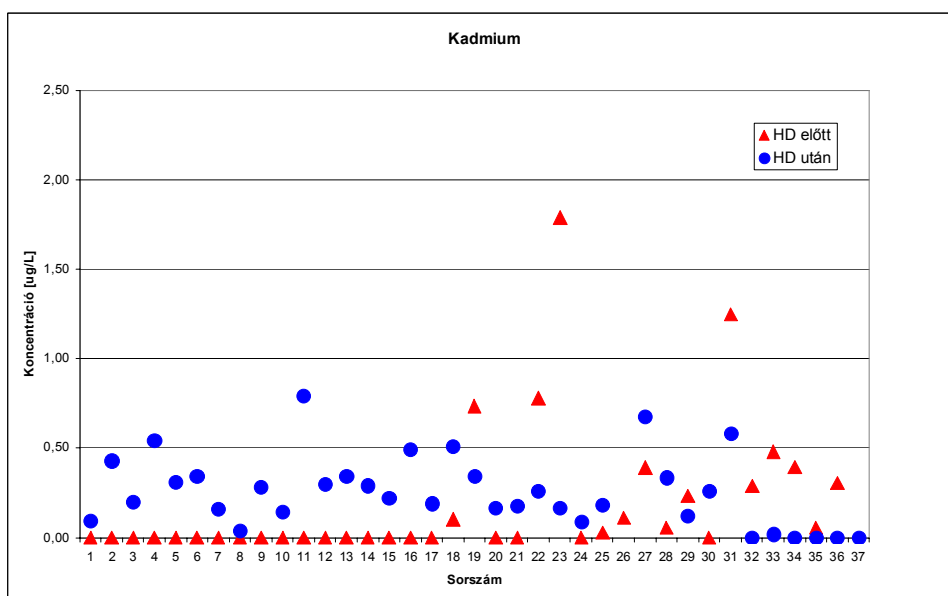


22. ábra: a stroncium koncentrációjának változása a szérumban a dialízis hatására

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

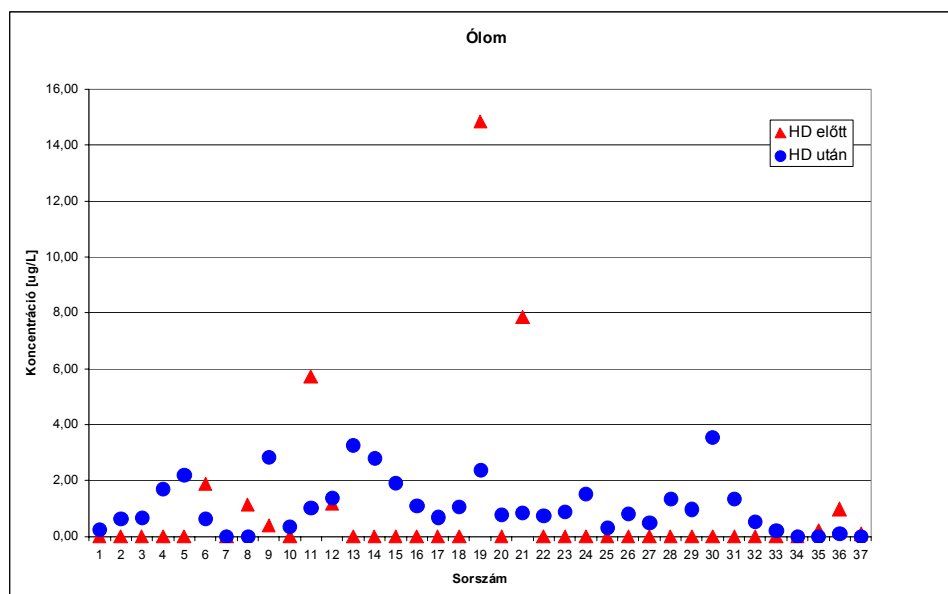


23. ábra: a molibdén koncentrációjának változása dialízis hatására



24. ábra: a kadmium koncentrációjának változása a dialízis során

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



25. ábra: az ólom koncentrációjának változása a dialízis hatására

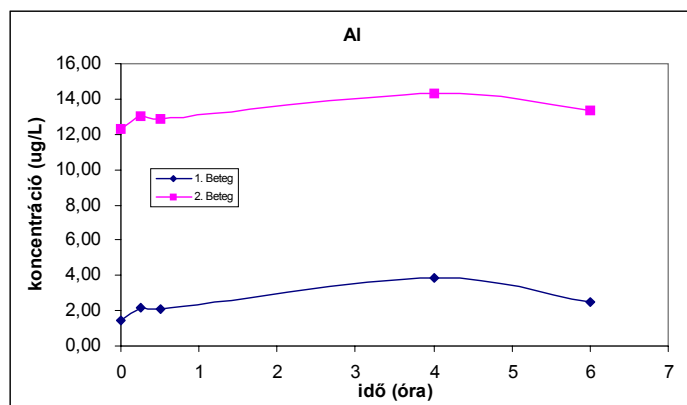
A 15. ábrán látható, hogy az alumínium koncentrációja kis mértékben növekedett a dialízis kezelés hatására, bár ez az átlagértékek összehasonlításával nem mutatható ki egyértelműen. A mangán koncentrációjának változása figyelhető meg a 16. ábrán. Az átlagértékeknek megfelelően itt egyértelmű növekedést figyeltem meg a dialízis kezelés befejezése után. Vas esetében (17. ábra) az átlagkoncentrációkkal összhangban nem figyelhető meg egyértelmű változás a dialízis hatására. A néhány kiemelkedően magas mértékű érték a vérminta hemolízisének következménye. A kobalt (18. ábra), nikkel (19. ábra) és réz (20. ábra) koncentrációja sem változik jelentősen a hemodialízis következtében, az eredmények között kis mértékű csökkenés és növekedés egyaránt szerepelt. A cink koncentrációja az átlagértékek alapján csökken, a 21. ábrán látható adatok viszont azt mutatják, hogy ez csak a betegek egy részére igaz. A stronciumnál az átlagértékeknek megfelelően az egyes betegek eredményei is kis mértékű növekedést mutatnak a dialízis kezelés hatására (22. ábra). Molibdén esetében csökkenést tapasztaltam (23. ábra). A 24. ábrán látható, hogy a kadmium koncentrációja az átlagértékekkel ellentétben a betegek többségénél kis mértékben növekedett a dialízis kezelés során. Az ólom

koncentrációjának növekedése (25. ábra) a számított átlagkoncentrációkhoz hasonlóan, néhány kiugró adattól eltekintve a betegek többségénél egyértelmű volt. Látható, hogy a dialízis kezelés a különféle nyomelemek koncentrációját különböző módon befolyásolhatja, azok kötésformáinak, mobilitásának, illetve előfordulásának függvényében.

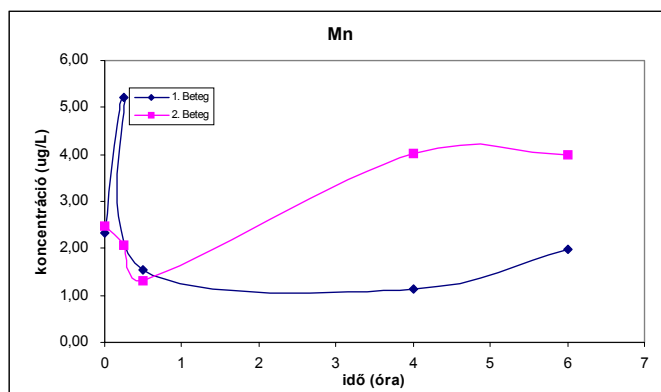
Összegezve, a vizsgált nyomelemek közül a dialízis kezelés hatására növekedést figyeltem meg az Al, Mn, Sr, Cd és Pb koncentrációjában, csökkenést a Zn és Mo esetében, míg az Fe, Co, Ni és Cu koncentrációja nem változott jelentősen.

### 5.5.3.2. A nyomelemek koncentrációjának változása a dialízis kezelés során

A dialízis követése során néhány betegtől a dialízis előtt, a dialízis megkezdése után 15 és 30 perccel, a dialízis végén (általában 4 óra) és a dialízis befejezése után 2 órával történt mintavétel. A szérum minták elemzését a korábbiakban részletezett módon végeztem el, a mérések ICP-MS és GFAAS módszerrel történtek. A vizsgált elemek koncentrációjának dialízis során bekövetkező változásait 2 beteg adataival mutatom be a 26-36. ábrákon.

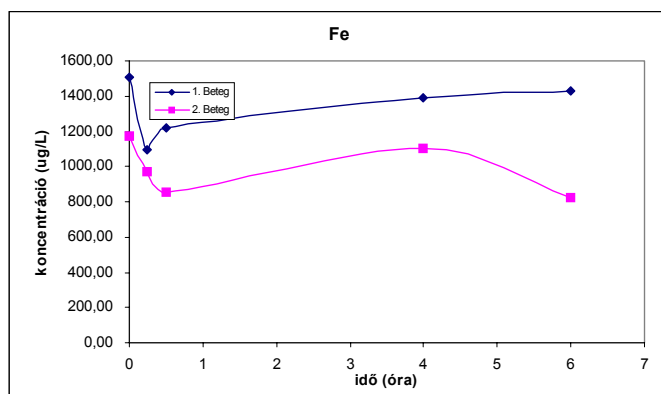


26. ábra: az alumínium koncentrációjának változása a dialízis során

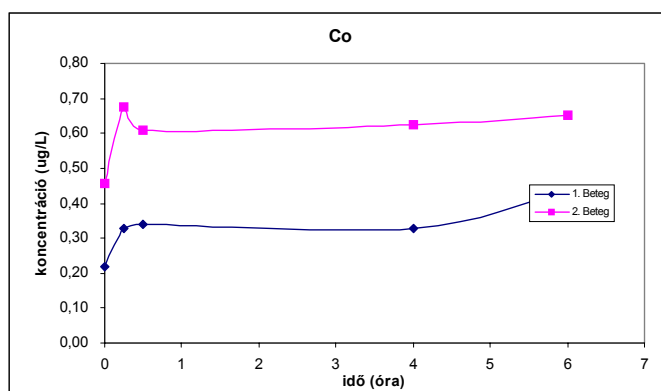


27. ábra: a mangán koncentrációjának változása a dialízis során

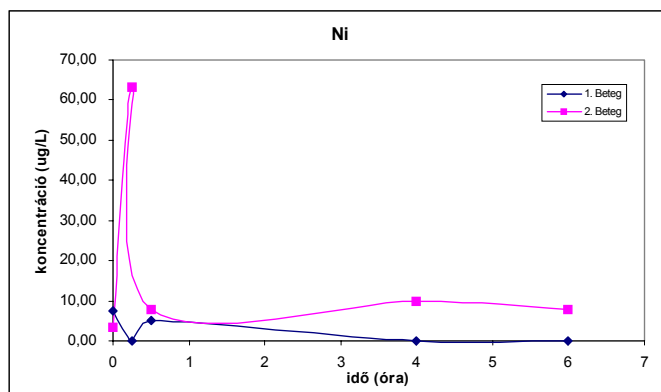
## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



28. ábra: a vas koncentrációjának változása a dialízis során

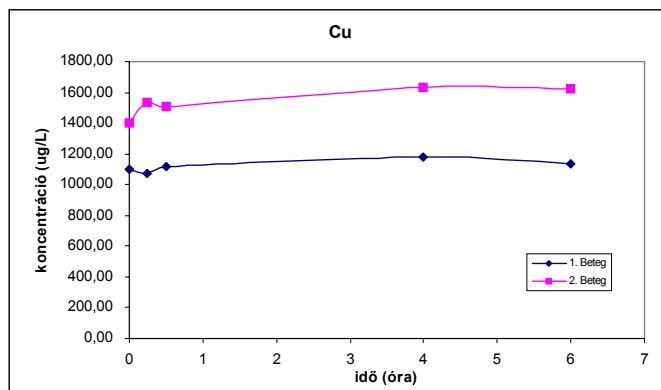


29. ábra: a kobalt koncentrációjának változása a dialízis hatására

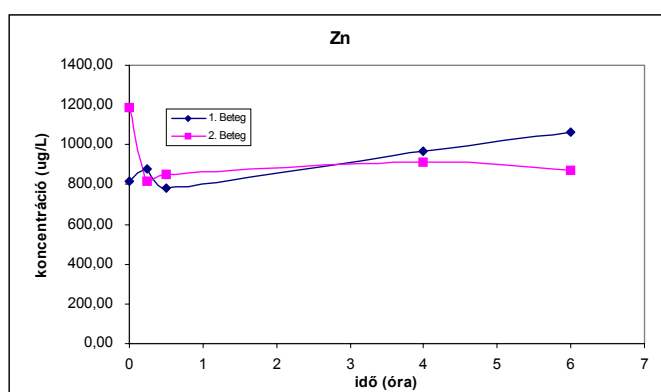


30. ábra: a nikkell koncentrációjának alakulása a dialízis alatt

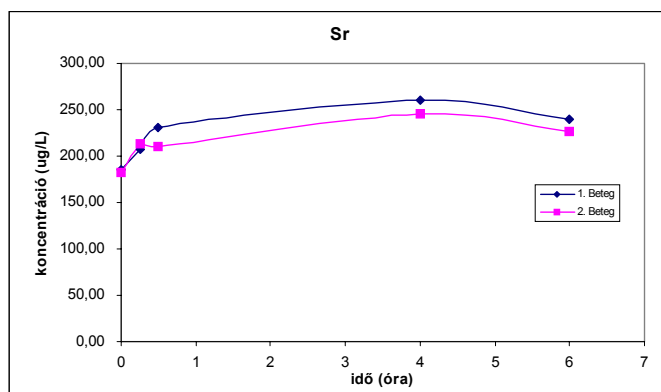
## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



31. ábra: a réz koncentrációjának változása a dialízis hatására

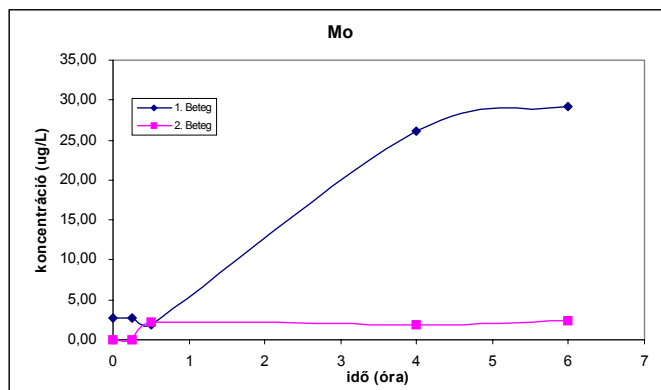


32. ábra: a cink koncentrációjának változása a dialízis alatt

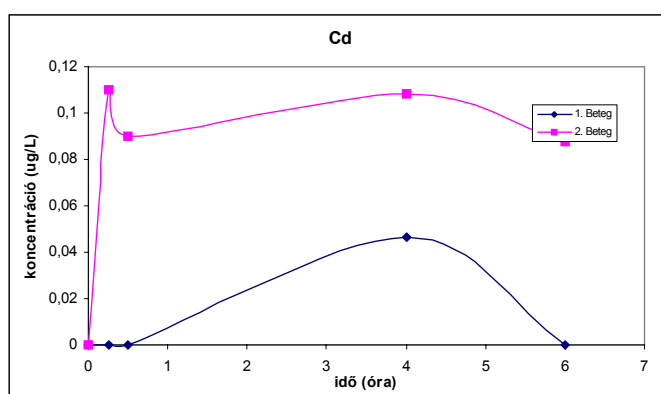


33. ábra: a stroncium koncentrációjának változása a dialízis során

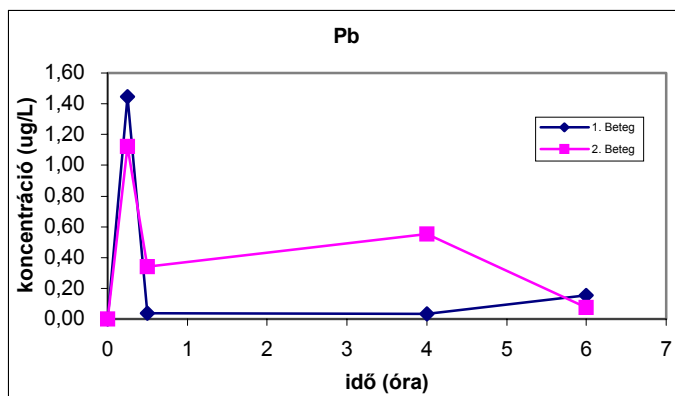
## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



34. ábra: a molibdén koncentrációjának változása a dialízis alatt



35. ábra: a kadmium koncentrációjának alakulása a dialízis hatására



36. ábra: az ólom koncentrációjának változása a dialízis során

Az alumínium koncentrációja a betegek nagy részénél hasonló módon változott (26. ábra). A kezdeti kisebb koncentráció a dialízis során fokozatosan nőtt, majd a dialízis után fokozatosan csökkent. A dialízis után 2 órával azonban még mindig a dialízis előtti érték fölötti koncentrációkat mértem. A mangán koncentrációja a betegeknél különböző módon változott a dialízis folyamán (27. ábra), és a dialízis végén, ill. után mért koncentráció az esetek többségénél a kiindulási érték fölött volt. A vas esetében a koncentráció a dialízis elején kis mértékben csökkent, a továbbiakban viszont stabil volt, ill. a betegek egy részénél csökkent (28. ábra). A kobalt koncentrációja a kezdeti növekedéstől eltekintve a teljes kezelés alatt stabilnak mondható (29. ábra). A nikkell koncentrációjában nem tapasztaltam jelentős különbségeket a dialízis előtti és utáni koncentrációkban, azonban a dialízis követése során néhány betegnél a koncentráció ugrásszerű emelkedését figyeltem meg. A kezelés további részében a koncentráció minden betegnél hasonlóan alakult (30. ábra). A réz koncentrációja a dialízis során és után alig változott, kimosódást vagy felhalmozódást nem tapasztaltam (31. ábra). Cink esetében a betegek többségénél a koncentráció csökkenése játszódott le, általában a dialízis elején, utána pedig alig változott (32. ábra). Néhány betegnél ezzel ellentétben kis mértékű növekedést tapasztaltam. A stroncium koncentrációja növekedett a dialízis során a betegek szérumában. Ez a növekedés a betegek többségénél a kezelés első harmadára tehető (33. ábra). A molibdén és kadmium koncentrációja (34. és 35. ábra) a dialízis során növekedett a betegek szérumában, bár a növekedés mértéke nagyon eltérő volt. E különbségek oka valószínűleg a kórtörténetben keresendő. A kadmium esetében az alumíniumhoz és a krómhoz hasonlóan a dialízis befejezése után a koncentráció csökkenését figyeltem meg. Az ólom koncentrációja a kezelés elején ugrásszerűen megnövekedett, majd lecsökkent, a kezelés végén, illetve a kezelés után mért értékek meghaladták a kezdeti koncentrációkat (36. ábra).

Az eredmények az elemek többségénél jól egyeznek a korábbi, csak a dialízis előtt ill. után vett minták eredményeivel; az eltérések valószínű oka az, hogy a különböző elemek koncentrációjának egyensúlya a vérben eltérő idő alatt állhat be. A dialízis előtt és után, illetve a dialízis során vett minták eredményeiből látható, hogy a kezelés komoly hatást gyakorol a betegek nyomelem státuszára. A dialízis kezelés hatására az esszenciális elemek közül a vas, króm és cink koncentrációjának

csökkenését figyeltem meg, míg néhány toxikus elem mennyisége (pl. alumínium, stroncium, kadmium és ólom) megnőtt a vérben. Megállapítottam továbbá, hogy a kezelés során a betegeknek általános egészségi állapotától és kórtörténetétől függően különböző mértékben változhat a nyomelemek koncentrációja a vérben. Ezért fontos a hemodialízis kezelés alatt álló betegek nyomelem státuszának rendszeres ellenőrzése, különös tekintettel a kimosódó eszenciális, és az esetleg felszaporodó toxikus elemekre. Az eszenciális nyomelemek pótlását pedig a nagy egyéni különbségek miatt az analitikai eredmények és a rendszeres monitorozás alapján személyre szabottan kell megvalósítani.

5.5.4. A diagnózis és a nyomelem státusz összefüggései

A nyomelem státusz és a diagnózis közötti kapcsolat vizsgálata során a betegeket a veseelégtelenség diagnózisa alapján csoportosítottam, és az egyes csoportok közötti kapcsolatokat és eltéréseket vizsgáltam.

A betegeket a diagnózis alapján öt csoportba lehetett beosztani:

- Vascularis okokra visszavezethető veseelégtelenség (Vasc)
- Diabetes Mellitus (DM)
- Glomerulo Nephrosis (GN)
- Tubulo Interstitialis Nephrosis (TIN)
- Egyéb, a fentiektől eltérő diagnózis, ill. a diagnózis nem állapítható meg.

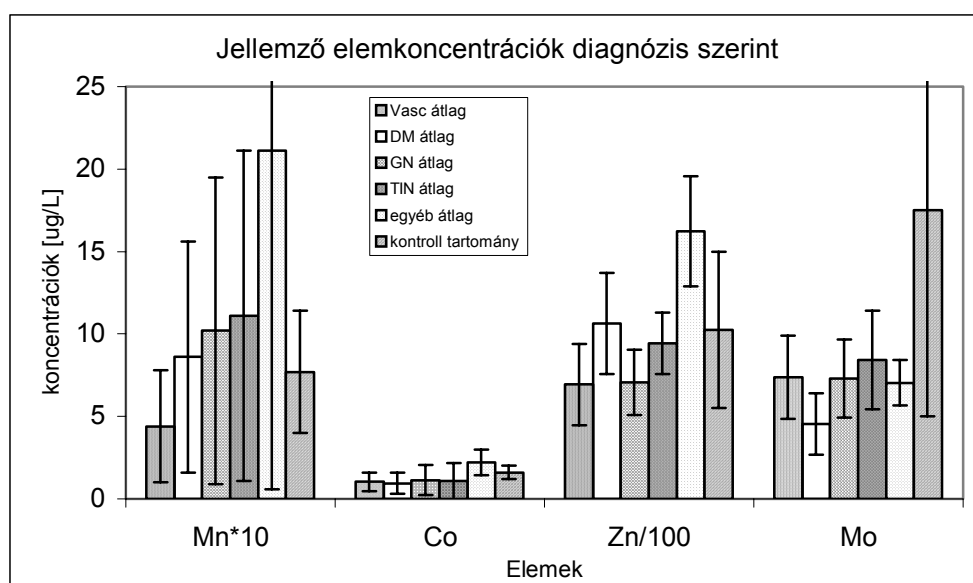
A fenti csoportosítás szerint a betegek szérumában mért nyomelem koncentrációk a 30. táblázatban láthatók. A kiemelt elemek összehasonlítása külön, a 37. ábrán szerepel.

| elem      | Vasc         |      | DM          |      | GN         |      | TIN   |      | egyéb       |      |
|-----------|--------------|------|-------------|------|------------|------|-------|------|-------------|------|
|           | átlag        | ±SD  | átlag       | ±SD  | átlag      | ±SD  | átlag | ±SD  | átlag       | ±SD  |
| <b>Al</b> | 5,27         | 0,47 | 5,26        | 0,55 | 9,01       | 5,94 | 5,45  | 0,65 | 5,25        | 0,63 |
| <b>Mn</b> | <b>0,44</b>  | 0,54 | 0,86        | 1,06 | 1,02       | 1,33 | 1,11  | 1,2  | <b>2,11</b> | 2,05 |
| <b>Fe</b> | 1014,0       | 254  | 974         | 347  | 997        | 385  | 1201  | 159  | 534         | 76,1 |
| <b>Co</b> | 1,03         | 0,58 | 0,95        | 0,65 | 1,14       | 0,9  | 1,07  | 1,12 | <b>2,22</b> | 0,78 |
| <b>Ni</b> | 8,27         | 3,8  | 12,2        | 13,3 | 8,83       | 7,24 | 16,6  | 18,8 | 8,73        | 1,05 |
| <b>Cu</b> | 1317         | 344  | 1129        | 239  | 1217       | 235  | 1231  | 208  | 1239        | 343  |
| <b>Zn</b> | <b>693,0</b> | 246  | 1064        | 306  | <b>707</b> | 198  | 943   | 187  | <b>1622</b> | 335  |
| <b>Sr</b> | 212,0        | 21   | 229         | 37,6 | 231        | 46,1 | 248   | 22,4 | 241         | 4,98 |
| <b>Mo</b> | 7,38         | 2,52 | <b>4,55</b> | 1,87 | 7,3        | 2,37 | 8,43  | 2,99 | 7,04        | 1,37 |
| <b>Cd</b> | 2,21         | 3,53 | 0,25        | 0,25 | 0,15       | 0,18 | 0,39  | 0,42 | 0,01        | 0,01 |
| <b>Pb</b> | 0,10         | 0,1  | 0,36        | 0,36 | 2,14       | 3,07 | 0,18  | 0,28 | 2,87        | 2,85 |

30. táblázat: a nyomelemek koncentrációjának változása a diagnózis szerint (adatok µg/L-ben)

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Látható, hogy néhány vizsgált nyomelem koncentrációja jelentősen eltér bizonyos diagnózisok esetében a többi csoportban talált értéktől. Vasculáris okokra visszavezethető megbetegedés esetében a Mn és Zn koncentrációja alacsonyabb volt mint a többi csoportban (rendre 0,44  $\mu\text{g/L}$  , 0,8-1,2  $\mu\text{g/L}$  és 693  $\mu\text{g/L}$  , 943-1622  $\mu\text{g/L}$ ). Diabetes mellitus esetében a molibdén koncentrációja a betegek szérumában kb. a fele volt, mint a többi betegcsoportnál (4,55  $\mu\text{g/L}$  , 7,0-8,4  $\mu\text{g/L}$ ).



37. ábra: a jellemző elemkoncentráció különbségek az egyes betegcsoportok között (koncentrációk  $\mu\text{g/L}$ -ben)

A glomerulo nephrosisos betegeknél a vasculáris okokhoz hasonlóan a cink koncentrációja a többi betegcsoportnál alacsonyabbnak bizonyult (707  $\mu\text{g/L}$  , 943-1622  $\mu\text{g/L}$ ). Egyéb, nem azonosítható okok esetében a mangán és kobalt és cink magas koncentrációját figyeltem meg (rendre 2,11  $\mu\text{g/L}$  , 2,22  $\mu\text{g/L}$  , és 1622  $\mu\text{g/L}$ ). A tapasztalt eltérések okainak kiderítésére további klinikai vizsgálatok szükségesek.

### 5.5.5. A mért nyomelem koncentrációk és néhány biokémiai paraméter közti összefüggés

Egy népesség egészségi állapotának, egyik fontos mutatója a nyomelemekkel való ellátottság, valamint az egészségre káros fémek esetleges akkumulációjának mértéke a szervezetben. A fémek és vegyületeik a legtöbb biológiai folyamatra jelentős hatást gyakorolnak. A nyomelemek mennyisége, mint pl. az oxidációs folyamatok szabályozásában szerepet játszó metalloproteinek alkotó részei, azaz cink (Zn), réz (Cu), mangán (Mn), szelén (Se), vas (Fe) és megoszlása a humán plazmában, a vér alakos elemeiben, önmagában is fontos jele egy populáció egészségi állapotának. A nyomelem státusz meghatározása ezért az egészséges populációban is fontos feladat.

A rendszeres dialízis kezelés alatt álló betegek és a kontroll személyek szérumban mért átlagos nyomelem koncentrációk a cink, kadmium és ólom kivételével jelentős eltérést mutattak. A kontrollokhoz képest a betegeknél a szérumban mangán koncentrációjának szignifikáns csökkenését, míg a Ni, Cu, Co és Mo szignifikáns növekedését állapítottam meg. A cink koncentrációja mind a betegek, mind a kontrollok esetében a referencia tartomány alsó határához közeli értéknek adódott.

A nyomelemek koncentrációjának jelentős eltérése a betegek szérumban a kontrollokhoz képest részben a dialízis kezelésnek, részben pedig az étrendi megszorításoknak tudható be. Annak kiderítésére, hogy a krónikus vesebetegekben tapasztalt megváltozott nyomelem koncentrációk összefüggésben állnak-e néhány biológiai paraméterrel, ill. a betegek kórtörténetével, a DE OEC I Belgyógyászati Klinika munkatársaival együttműködve végeztünk vizsgálatokat. A kiválasztott és meghatározott biokémiai paraméterek mindegyike szoros kapcsolatban áll bizonyos nyomelemekkel, pl. a nyomelemek az enzimek kofaktorai (szuperoxid dizmutáz, SOD: Cu, Zn, Mn vagy xantin oxidáz, XO: Mn, Mo) vagy egy metabolikus körben több ponton is szabályozó szerepük van (pl. Co, Ni).

E fejezetben az általam mért nyomelem koncentrációk mellett olyan eredményeket is felhasználtam, melyeket konzulensem, Dr. Varga Zsuzsa vezetésével határoztak meg a DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinikáján. Ezek főleg enzimkoncentráció és –aktivitás eredmények voltak, melyekkel saját eredményeimet kiegészítve jutottunk a fejezetben megfogalmazott következtetésekre.

### 5.5.5.1. A szérumban a Co, Ni koncentrációja és a homocisztein kör kapcsolata

A vizsgált nyomelemek közül a Co és a Ni a metionin és folsav metabolizmusban játszik szerepet, a Co az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen B<sub>12</sub> vitamin (cianokobalamin) központi fémionja. Mindkét nyomelem esszenciális a szervezetben fiziológiásan metioninból keletkező homocisztein metioninná történő visszaalakításban. A szervezet szükségleteitől függően, metioninhiány esetén a homocisztein a folsav ciklus segítségével alakul vissza metioninná. E ciklusban (homocisztein kör) játszik fontos szerepet a kobalt és a nikkel. A kobalt szerepéről tudott, hogy mint a B<sub>12</sub> vitamin központi fémionja szükséges a kör működéséhez, míg a nikkel konkrét szerepe ismeretlen, azonban állatkísérletek alapján egyértelmű bizonyítékok vannak arra, hogy a Co és a Ni sóformában adva a táplálékhoz, csökkenti a homocisztein szinteket. A homocisztein felszaporodása bizonyos esetekben megfigyelhető, és demográfiai adatok bizonyítják, hogy a magas homocisztein szint önálló rizikó faktora a szív és érrendszeri megbetegedéseknek. HD betegek azon veszélyeztetett csoportba tartoznak, akiknél mind a szív és érrendszeri megbetegedések, mind a magas homocisztein szint nagy gyakorisággal fordul elő. A HD betegek a homocisztein szintjének csökkentésére folsavat kapnak, azonban sok olyan beteg van aki rezisztens a folsav kezelésre. Az állatkísérletek eredményei valamint a HD betegekben talált, a kontrolltól eltérő Co és Ni státusz alapján megvizsgáltuk, hogy ezekben a betegekben van-e kapcsolat a nyomelemek és a homocisztein-metionin körben fontos B<sub>12</sub> vitamin, folsav és homocisztein koncentrációk között.

Azt tapasztaltuk, hogy a rendszeres dialízis kezelés alatt álló betegek esetében a szérumban a Co és Ni koncentrációjának átlaga szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrolloké. A betegek kb. azonos részének volt a kimutatási határ alatti (0,04 µg/L), ill. a referencia tartomány felső határánál (2 µg/L) magasabb Co-szintje. A nikkel koncentrációja a betegek kb. 50 százalékánál a referencia tartomány felső határa fölötti volt.

A betegekben meghatározott homocisztein, B<sub>12</sub> vitamin és folsav koncentrációkat összevetettük a szérumban mért Co és a Ni koncentrációkkal. Vizsgálatok során azt

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

találtuk, hogy azokban a betegekben, akikben a normál tartomány fölötti volt a szérumban kobalt koncentrációja, a homocisztein koncentrációja jelentősen nagyobb, míg a B<sub>12</sub> vitamin koncentrációja kisebb, mint amit a normál tartományba eső kobalt szintű betegek szérumban találtunk (31. táblázat). A szérumban nikkell koncentrációjának függvényében ellentétes változást figyeltünk meg, azaz a szérumban homocisztein koncentráció szignifikánsan alacsonyabb, a B<sub>12</sub> vitamin koncentráció magasabb volt azokban a betegekben, akikben a szérumban nikkell koncentráció magas volt. Nem volt különbség a folsav szintekben egyik csoport esetén sem, ami a betegek napi 2 mg folsav-pótlásának tulajdonítható.

| Koncentrációk<br>μg/L-ben | Co < 2μg/L | Co > 2μg/L | <i>t</i> | Ni < 5μg/L | Ni > 5μg/L | <i>t</i> |
|---------------------------|------------|------------|----------|------------|------------|----------|
| B <sub>12</sub> vitamin   | 648±328    | 377±131    | 8,274*   | 475±189    | 633±342    | -2,508** |
| Homocisztein              | 20,5±6,06  | 24,6±3,5   | -2,706** | 25,7±7,6   | 18,9±6,5   | 2,684**  |
| Folsav                    | 20,2±15,9  | 27,7±16,7  | -1,887   | 23,7±17,8  | 21,5±15,7  | 0,371    |
| Co                        | 0,75±0,48  | 2,61±0,3   | --       | 1,16±0,96  | 1,43±0,74  | --       |
| Ni                        | 10,8±10,4  | 18,9±16,4  | --       | 2,11±1,66  | 21,5±15,9  | --       |

31. táblázat: A B<sub>12</sub> vitamin, homocisztein és a folsav mennyiségének összefüggése a Co és Ni koncentrációjával krónikus vesebetegek esetében (Student T-próba, \*: p<0,05; \*\*:0,05<p<0,1)

A kobalt, nikkell, B<sub>12</sub> vitamin, folsav és homocisztein között hasonló kapcsolatot a kontrollokban nem vizsgálhattunk, ugyanis a kontrollok szérumban sem a kobalt, sem a nikkell esetében a normál tartomány felső határát meghaladó értéket nem mértem. Az eredmények azt mutatják, hogy a Ni szérumban koncentrációjának emelkedése együtt jár a homocisztein metabolizmus javulásával (amit az alacsonyabb homocisztein és a magasabb B<sub>12</sub> vitamin szint jelez), ugyanakkor a szérumban Co koncentrációjának kisebb mértékű megemelkedése (ami a HD betegek egy részére jellemző volt) nincs ilyen pozitív hatással. Az eredmények összhangban állnak az állatkísérletek eredményeivel, ahol a nikkellnek hasonló pozitív hatása volt a homocisztein metabolizmusra. Az a mechanizmus, amelyen keresztül a nikkell ezt a hatást kifejti, jelenleg még ismeretlen.

### 5.5.5.2. A szérum Cu, Zn, Mo, Mn koncentrációja és a metallo-enzimek aktivitása közötti kapcsolat

A Cu, Zn, Mn és Mo számos enzim működéséhez szükséges kofaktor. Jelen munkában annak illusztrálására, hogy a nyomelem összetétel eltérése az optimálistól befolyásolja az enzimek működését, vizsgáltam a szuperoxid dizmutáz (SOD) és a xantin oxidáz (XO) aktivitásának alakulását a nyomelem koncentrációk függvényében. A SOD feladata, hogy a sejteket vagy szöveteket megvédje a szuperoxid anion gyök ( $O_2^-$ ) okozta károsodástól. A SOD megtalálható a citoplazmában, a mitokondriumban és az extracelluláris térben egyaránt. A citoplazmában és a keringésben megtalálható formája rezet és cinket, míg a mitokondriális formája mangánt igényel kofaktorként. A másik tanulmányozott enzim, a xantin-oxidáz (XO) felelős a purin- és pirimidin bázisok lebontásáért, e folyamat közben  $O_2^-$  gyökök is termelődnek. A XO működéséhez molibdén és mangán szükséges.

A mért minták átlagos cink koncentrációja betegek és kontrollok esetében is az irodalmi normál tartomány alsó értékéhez volt közeli és nem különbözött egymástól jelentősen. Ezen belül a betegek 38 százalékában a normál érték alatti, míg 14 százalékában a normál tartomány fölötti koncentrációkat mértem.

A betegek szérumában a réz koncentrációja a kontrollokhöz képest jelentősen magasabb volt, és a betegek 19 százalékánál meghaladta a referencia tartomány felső határát (1500  $\mu\text{g/L}$ ) is.

A molibdén koncentrációja az egészséges személyek szérumában általában 5  $\mu\text{g/L}$ -nél alacsonyabb volt. A betegeknél azonban a molibdén koncentráció az esetek több mint 60 százalékánál a referencia tartomány fölött volt.

A betegek egy részénél (30 %) a mangán koncentrációja jóval alacsonyabb az egészséges határértéknél és néhány esetben a kimutatási határ alatt volt (v.ö. 27-28. táblázatok)

A 32. táblázatban láthatók a betegek és kontrollok szérumában mért SOD aktivitásának és a Cu, Zn, és Mn koncentrációknak az összefüggései. Az enzimek aktivitását Unit/liter (U/L), ill. Unit/milliliter (U/mL) egységben adtuk meg, ennek

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

definíciója enzimenként változik. SOD esetén 1 Unit az aktivitás akkor, ha az enzim 50%-kal gátolja a citokróm C redukcióját a xantin/xantin-oxidáz rendszerben (pH=7.8, t=25°C), ahol a xantin-oxidáz mennyiségét úgy kell megválasztani, hogy a citokróm C redukciójának sebessége  $\Delta_{\text{abs}}=0.025/\text{min}$  legyen 550 nm-en mérve. XO esetében az aktivitás 1 Unit akkor, ha az enzim 1  $\mu\text{mol}$  xantint konvertál húgysavvá percenként (pH=7.8, t=25°C,  $\lambda=295\text{nm}$ ) [90].

| Nyomelem szint            | SOD aktivitás (U/mL) |           | <i>t</i> |
|---------------------------|----------------------|-----------|----------|
|                           | HD beteg             | Kontroll  |          |
| Mn < 2 $\mu\text{g/L}$    | 0,98±0,14            | --        | --       |
| Mn > 2 $\mu\text{g/L}$    | 0,92±0,12            | 1,16±0,11 | 4,000*   |
| Cu < 1100 $\mu\text{g/L}$ | 0,93±0,15            | 1,16±0,11 | 3,066*   |
| Cu > 1100 $\mu\text{g/L}$ | 0,99±0,10            | --        | --       |
| Zn < 800 $\mu\text{g/L}$  | 0,90±0,11            | 1,13±0,08 | 5,532*   |
| Zn > 800 $\mu\text{g/L}$  | 1,045±0,15           | 1,19±0,11 | 2,368**  |

32. táblázat: a szérumban SOD aktivitása és a Mn, Cu és Zn koncentrációjának összefüggései (U/mL: Unit/mL, a mértékegység magyarázatát lásd a szövegben) (Student T-próba, \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $0,05 < p < 0,1$ )

A kontrollokkal összehasonlítva a betegek esetében a szérumban SOD aktivitás átlaga szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollokban mért érték (1,02±0,21 U/mL, 1,16±0,11 U/mL,  $p < 0,05$ ). A kontrollok között olyan egyént, akinek a szérumban alacsony mangán illetve magas réz koncentráció lett volna, nem találtunk. A HD betegekben a szérumban SOD aktivitása nem függött jelentősen attól, hogy a szérumban Mn és Cu koncentrációja a normál tartományba esett vagy eltért attól. Jelentős különbséget találtunk azonban a szérumban SOD aktivitásában a cink koncentráció függvényében. Voltak olyan kontrollok, akiknek a szérumban a cink koncentrációja kisebb volt mint 800  $\mu\text{g/L}$ , ezeknek a kontrolloknak a többi kontrollhoz képest kisebb volt a SOD aktivitása is. Azokban a HD betegekben, akikben cink hiányt találtunk, szignifikánsan csökkent SOD aktivitást mértünk, nemcsak a kontrollokhoz, hanem a normál cink koncentrációjú HD betegekhez képest is. Azokban a HD betegekben, akikben a szérumban cink-tartalma a normál

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

tartományba esett a szérum SOD aktivitása is az egészséges kontrollokéval egyezett meg.

Ezek az eredmények alátámasztják azt, hogy a cink koncentrációja (elsősorban a cink-hiány) igen fontos a SOD enzim aktivitása és az immunrendszer megfelelő működése szempontjából.

A XO aktivitás fokozottabb volt a HD betegekben, mint a kontrollokban, azonban a különbség a nagy szórás miatt nem volt szignifikáns ( $3,47 \pm 0,84$ ;  $3,24 \pm 0,44$  U/L). A szérum XO aktivitásának és a Mo, Mn koncentrációjának összefüggéseit a 33. táblázat tartalmazza. Látható, hogy a betegek esetében a szérum XO aktivitása kiemelkedően nagy azoknál a betegeknél, akik szérumában a Mn koncentrációja  $2 \mu\text{g/L}$ -nél kisebb.

| Nyomelem szint         | XO aktivitás (U/L) |                 | <i>t</i>     |
|------------------------|--------------------|-----------------|--------------|
|                        | HD beteg           | Kontroll        |              |
| Mo < 5 $\mu\text{g/L}$ | $3,59 \pm 1,08$    | $3,24 \pm 0,44$ | -0,648       |
| Mo > 5 $\mu\text{g/L}$ | $3,41 \pm 0,74$    | -               | --           |
| Mn < 2 $\mu\text{g/L}$ | $3,74 \pm 0,74$    | -               | --           |
| Mn > 2 $\mu\text{g/L}$ | $2,87 \pm 0,99$    | $3,24 \pm 0,44$ | $2,636^{*a}$ |

33. táblázat: a XO aktivitás és a Mo és Mn koncentrációjának összefüggései (Student T-próba, \*:  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup>: a  $2 \mu\text{g/L}$  alatti szérum Mn koncentrációjú betegekhöz képest)

A kontrollok között nem volt olyan, akinek szérumában a Mo koncentrációja nagy, vagy a Mn koncentrációja kicsi lett volna a referencia tartományokhoz képest. A dializált betegek között nem volt szignifikáns különbség a XO aktivitásban akkor, ha a szérum Mo koncentrációja a normál tartományba esett ( $5 \mu\text{g/L}$ -nél alacsonyabb) vagy annál magasabb volt.

Krónikus veseelégtelenségben az oxidációs stressz fokozódása ismert, ennek hátterében számos ok felfedezhető, pl. maga a vesepótló kezelés is, különösen, ha nem biokompatibilis membránnal történik. Az eritrociták SOD aktivitásának

csökkenését Cu, Zn vagy Se hiányos vesebetegekben már leírták. Az itt bemutatott adatok bizonyítják, hogy a szérum antioxidáns kapacitását (SOD aktivitás) és reaktív oxigén gyök termelését (XO aktivitás) azon nyomelemek koncentrációja befolyásolja, amelyeket az enzimek kofaktorként alkalmaznak. Megváltozott működés azokban az esetekben figyelhető meg, akiknél a koncentráció eltér a normál tartománytól, mégpedig kisebb az adott elem koncentrációja (azaz Zn hiány esetén a SOD szignifikánsan alacsonyabb, Mn hiány esetén az XO aktivitás szignifikánsan magasabb a HD betegekben, mint a kontrollokban).

### 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során megvizsgáltam a humán haj, vér, plazma és szérum minták alkalmazási lehetőségeit a szervezet nyomelem státuszának meghatározására kontrollok és hemodialízis kezelésben részesülő betegek esetében. Felhívtam a figyelmet néhány, a mintavétellel, a minták előkészítésével, analitikai vizsgálatával és az eredmények kiértékelésével kapcsolatos speciális problémára, és ezek közül néhányra tudományos – technikai megoldást is találtam.

Az analitikai módszerek kidolgozása során különös figyelmet fordítottam a minták szennyeződési lehetőségeinek csökkentésére a mintaelőkészítés során. Hajminták esetében új eszközöket terveztem és készíttettem, melyekkel a minták mintavétel során történő szennyeződése megakadályozható. A minták előkészítésére a napjainkban legkorszerűbbnek számító zárt rendszerű teflonbombás mikrohullámú roncsolást használtam, és ennek hiányosságait kvarcbetétek alkalmazásával sikerült kiküszöbölnöm. Analitikai módszereket dolgoztam ki a fenti minták elemzésére, és megállapítottam, hogy a vizsgált elemek koncentrációja, a mintavétel, a minták tárolásával és kezelésével kapcsolatos technikai, biztonsági és egészségügyi szempontok alapján a hajminták a legveszélytelenebbek a szervezet nyomelemstátuszának vizsgálatára. Probléma viszont, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre olyan mintaelőkészítési módszer, mellyel a hajminták exogén szennyeződése úgy távolítható el vizsgálat előtt, hogy az endogén nyomelem összetétel ne változzék. A nagy számú publikáció ellenére továbbra is gond a klinikai gyakorlatban elfogadott referencia koncentráció tartományok hiánya, ezek nélkül a hajelemzés a szervezet nyomelem státuszának felmérésére nem alkalmazható megbízhatóan.

Ezzel szemben a vér, szérum, ill. plazma minták elemzése a klinikai gyakorlatban elterjedt, így a szükséges referenciák ha jelentős szórással is, de rendelkezésre állnak. Munkám során a különböző minták összehasonlító vizsgálatain túl a hangsúlyt a humán szérum minták elemzésének fejlesztésére helyeztem. Az általam kifejlesztett és optimált analitikai módszereket nemzetközi referencia minták segítségével ellenőriztem. A vizsálatok eredményei bizonyították, hogy az ICP-

OES, ICP-MS és GFAAS analitikai módszerek alkalmasak e minták nagy sorozatban végzett analízisére.

A beállított mintaelőkészítési módszerek alkalmazásával regionális referencia tarományokat állítottam fel bizonyítottan egészséges kontroll személyek szérum mintáinak vizsgálatával. Az így kapott referencia értékeket alkalmaztam a dialízis kezelés alatt álló betegek szérum mintáinak elemzése, valamint az eredmények kiértékelése során.

E betegcsoport nyomelem státusza jelentősen eltér az egészségestől, és ezen eltérések nagymértékben befolyásolhatják a betegek életkörülményeit, egészségi állapotát, a betegség lefolyását és a betegek túlélési esélyeit. Nagy jelentősége ellenére a nyomelem státusz rendszeres vizsgálata jelenleg sem megoldott e betegcsoportnál.

Vizsgáltam a dialízis során az alumínium véráramba történő közvetlen bejutását okozó, így kiemelkedően fontos alumínium forrásokat, és megállapítottam, hogy a víztisztító berendezés a követelményeknek megfelelő minőségű vizet állít elő a dialízishez, bár a készüléken eszközölhető változtatásokkal ez a tisztítás hatékonyabbá tehető.

Vizsgáltam a rendszeres hemodialízis kezelés alatt álló betegek és a kontrollok szérumának nyomelem összetételében mutatkozó eltéréseiket, és arra a következtetésre jutottam, hogy a betegek és a kontrollok nyomelem státusza a legtöbb vizsgált elem esetében jelentősen eltér. Ennek oka a betegeknél az étrendi megszorításokban és a dialízis kezelésben keresendő. Tanulmányoztam a betegeknél az egyszeri dialízis kezelés hatását a nyomelem státuszra és a nyomelemek koncentrációjának változását a dialízis folyamán. Azt tapasztaltam, hogy a dialízis kezelés a nyomelem státuszt jelentősen befolyásolhatja, és bizonyítottam, hogy egyes toxikus elemek felhalmozódása és eszenciális nyomelemek kimosódása jól nyomon követhető az analízisekkel. Az egyes nyomelemek koncentrációjában jelentős egyéni különbségeket figyeltem meg, amelyből az a következtetés vonható le, hogy a betegek nyomelem pótlása csak az analitikai eredmények ismeretében, szelektíven és egyénre szabottan oldható meg optimálisan.

Mivel a betegek nyomelem státusza jelentősen különbözött a kontrollokétól, megvizsgáltam, hogy a nyomelemek koncentrációjának megváltozása fiziológias folyamatokban bekövetkező változásokkal kapcsolatba hozható-e. Ennek illusztrálására meghatároztuk néhány metalloprotein aktivitását. Megállapítottam, hogy a betegekben gyakori cinkhiány csökkenti az antioxidáns hatású SOD enzim aktivitását, ill. a Mn koncentrációjának csökkenése károsan befolyásolja a XO aktivitását.

Összefüggést találtam a szérum Co, Ni koncentrációja és a betegek homocisztein státusza között. Megállapítottam, hogy a szérum Ni koncentrációjának emelkedése kedvezően befolyásolja a homocisztein szinteket.

A módszerfejlesztés és a gyakorlati alkalmazás során elért eredmények alapján megállapítottam, hogy a kifejlesztett analitikai módszer sikeresen alkalmazható mind az egészséges személyek, mind pedig különböző betegcsoportok mintáinak elemzésével a nyomelem státusz rendszeres vizsgálatára, az esetleges toxikus elem felhalmozódás vagy eszenciális nyomelem hiány megállapítására.

### 7. SUMMARY

In the last few decades the trace and ultratrace analysis of human biological samples become very important, because by using the obtained results of essential and toxic analytes, environmental exposures, nutritional and health problems can be determined.

The trace element analysis is a basic tool for diagnostic purposes in most highly-developed countries. In Hungary, similar studies were made in some specific areas, but more general research for clinical applications in the examined field has not been made yet.

The analytical study of the human biological samples and the evaluation of the results requires special care because of the discrepancies of methods and results available in the literature. The trace and ultratrace analysis of human biological samples is a challenge for the analyst. Usually the examined component is present in the sample in small quantities, hence sensitive analytical methods are needed for their detection and quantification. In addition, the presence of the biological matrix components requires special care during sample preparation.

The sample matrix needs to be digested in the sample solution, while the trace element content must remain intact, thus, contamination or losses of the examined trace elements must be prevented.

In addition to the analytical problems, the evaluation of the results is also difficult. This problem is due to several reasons: 1) the high biological deviation of the measured analytes even for healthy controls; 2) the lack of uniform, standardized methods for the preparation, analysis and evaluation of the examined human samples; 3) the huge differences observed for the healthy control ranges and the trace element levels of different patients in the literature.

For the study of the human trace element levels, usually blood (whole blood, plasma or serum), hair, nails, or other tissues are applied as the sample. The study of the trace element levels is especially important for those patients where the illness or the applied treatment can be sources of the changes in the trace element levels leading to the malfunctioning of the physiological processes in the body.

## 7. SUMMARY

---

During this work a group of patients undergoing regular haemodialysis (HD) treatment have been selected. In the case of these patients, the kidney problems result in several physiological problems, including the inability of the removal of toxic metal complexes from the circulatory system. The HD treatment may also increase the level of some toxic components in their body, and also can remove essential trace elements and their complexes. Hence the HD treatment may result in trace element lack or intoxication. Among the toxic elements, aluminium is especially important. Its accumulation in the body of the HD patients is already known, and its increased level is related to several problems and symptoms, including Alzheimer's disease, mental deficiencies, etc.

The aims of the present work and thesis were the following:

- the development of sampling and sample preparation method(s) for the preparation of large number of biological samples.
- to select the most useful human biological sample for the analytical study of the trace element levels of healthy controls and HD patients by analyzing and comparing several samples reported in the literature.
- to develop sensitive, multielemental analytical method(s) for the analysis of small amounts of biological materials.
- to determine local reference ranges for the selected analytes for healthy controls
- to determine the concentrations of selected trace elements in HD patients and to compare the obtained results to data in literature and to the results of the selected control group.
- to apply the developed method on the group of HD patients to determine the changes of trace element levels due to the HD treatment and to study the correlation between the trace element concentrations and their effects on the physiological parameters.
- to establish the possibility and analytical background for the regular check of the trace element levels of the HD patients.

During my work I have applied tantalum scissors and tungsten-carbide scalpels for the sampling of human hair. I have proved that by using these tools, hair samples are not contaminated with the examined trace elements. By using stainless steel

## 7. SUMMARY

---

scissors, scalpels or razor blades, samples were significantly contaminated with different analytes.

I have developed a washing method to remove the exogenous contamination from the hair surface. This method includes washing with organic solvent mixture (diethyl-ether:acetone=3:1), nonionic detergent solution (1% Decon-90 in triple distilled water) and high purity water. By using a homogeneous hair sample, it was shown, that with the developed washing procedure more reproducible results can be obtained than with other methods found in the literature.

High pressure microwave digestion was applied to destroy the organic matrix and to dissolve the samples. Sample amounts were decreased and the contaminations from the memory effect of the teflon vessels was eliminated by using quartz tubes inside the teflon vessels for the digestion. With this method, the number of samples digested in one cycle has been increased to 18 (originally it was 6).

The capabilities of the developed sample preparation methods were tested with standard reference materials (the applied amount of the materials varied between 1 and 50 mg). Alternative sample preparation method was developed for the determination of aluminium in biological samples to avoid aluminium contamination from the applied chemicals. This method involves trimethyl-ammonium-hydroxide (TMAH) which was applied for the dilution of the blood and serum samples prior to analysis.

The distribution of some analytes in the hair samples of healthy subjects and HD patients was studied with micro-PIXE method. It was shown, that the analytes are not homogeneously distributed in the hair. Hence the applied sample preparation methods (e.g. washing) may affect the endogeneous trace element content of the analysed hair sample.

Considerable differences were found between the obtained trace element concentrations in the serum samples and the results published in the literature. These discrepancies show that further study of the trace element levels of human biological samples and the establishment of local reference ranges are necessary. Comparing the results of the serum samples from healthy controls and HD patients, serious differences were found in the concentrations of Al, Ni, Cu, Mo, Cd and Pb. The accumulation of aluminium is an important problem for HD patients due to its toxicity. I examined the aluminium content of the water used during the HD

## 7. SUMMARY

---

treatment, and the instrument applied for its cleaning. It was shown, that the aluminium content may fluctuate in the cleaned water due to the changes in the aluminium content of the inlet water. However, the aluminium concentration in the cleaned water always remained well below the limit.

By analysing serum samples taken before, during and after the HD treatment, I found that the concentrations of Al, Mn, Sr, Cd and Pb is increased, the concentrations of Ni and Mo decreased, while the concentrations of Fe, Co, Ni and Cu remained nearly constant during the whole treatment.

By comparing the trace element levels and the results of the clinical tests, it has been proved, that there is a close relationship between the concentrations of Ni and Co and hyperhomocysteinaemia, which is an individual risk factor of the cardiovascular diseases. When the concentration of Ni was higher than the normal values in the serum of HD patients, the concentration vitamin B<sub>12</sub>, which play important role in the deposition of homocystein, is increased with a concomittant decrease of homocystein.

In addition, there was a correlation between the activity of superoxide dismutase (SOD), and xantin oxidase (XO) and the concentration of Zn, Cu and Mn. These enzymes play impotrant role in the formation and removal of reactive oxygen species, which concentration is usually higher in the serum of HD patients than the healthy range.

My results show that the developed method can be applied successfully for the determination of the trace element concentrations in human biological samples. By using this method it is possible to regularly check the trace element levels of healthy subjects and patients with various symptoms. The trace element concentrations may provide information and help for the early diagnosis of some diseases, and for the selective, individually optimized trace element supplementation.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] R.M. Barnes, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 355, 433-441
- [2] L. Moens, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 359, 309-316
- [3] J. Versieck, R. Cornelis, *Trace Elements in Human Plasma or Serum*, **1989**, CRC Press, Boca Ration
- [4] D. Pozebon, V.L. Dressler, A.J. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 1001-1005
- [5] D. Bohrer, P.C. do Nascimento, S.G. Pombum, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 635-639
- [6] J.L. Greger, J.E. Sutherland, *Crit. Reviews Clin. Lab. Sci.*, **1997**, 34(5), 439-474
- [7] M. Blanusa et al., *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **1997**, 48, 197-204
- [8] J.L. Fernández-Martín et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **1998**, 13/3, 78-81
- [9] D. Beauchemin, R. Kisilevsky, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 1026-1029
- [10] M. Laker, *The Lancet*, **1982**, July 31, 260-262
- [11] Y. Takagi et al., *Arch. Environ. Health*, **1985**, 32, 793-800
- [12] M.E. Druyan et al., *Biol. Trace Elem. Res.*, **1998**, 62, 183-197
- [13] D.E. Nixon et al., *Clin. Chem.*, **1986**, 32/9, 1660-1665
- [14] F. Marumo, Y. Tsukamoto, S. Iwanami, T. Kishimoto, S. Yamagami, *Nephron*, **1984**, 38, 267-272
- [15] R. Cornelis et al., *J. Trace Elements Med. Biol.*, **1996**, 10, 103-127
- [16] A. Chatt, S.A. Katz, *Hair Analysis*, **1988**, VHC Publishers, Inc., New York
- [17] P. Manson, S. Zlotkin, *Can. Med. Assoc. J.*, **1985**, 133, 186-188
- [18] K. Bencze, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 338, 58-61
- [19] A. Taylor, *Ann. Clin. Biochem.*, **1986**, 23, 364-378
- [20] V. Valkovič, N. Limič, *Nulc. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1987**, B22, 159-162
- [21] M.H. Ramsey, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 97-104
- [22] O. Senofonte, N. Violante, L. Fornarelli, E. Beccaloni, A. Powar, S. Caroli, *Ann. Ist. Super. Sanita*, **1989**, 25/3, 385-392
- [23] V. Valkovič, *Human Hair*, **1988**, CRC Press, Inc., Boca Raton
- [24] G.D. Renshaw, *Med. Sci. Law*, **1976**, 16/1, 37-39
- [25] S. Salmela, E. Vuori, J.O. Kilpiö, *Ann. Clin. Biochem.*, **1989**, 36, 457-469
- [26] J. Bacsó, P. Kovács, S. Horváth, *Radiochem. Radioanal. Letters*, **1978**, 33(4), 273-280
- [27] Bacsó József és munkatársai, *Magyar Belorvosi Archivum*, **1982**, 35, 245-250
- [28] J. Bacsó, G. Lesztig, A. Pál, I. Uzonyi, *Exp. Pathol.*, **1986**, 29, 119-125
- [29] B. Maddedu, A. Rivoldini, *Atomic Spectroscopy*, **1996**, 17(4), 148-154
- [30] R. Koplík, E. Čurdová, M. Suchánek, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1998**, 360, 449-451
- [31] S. Wu, X. Feng, A. Wittmeier, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, 12, 797-806
- [32] H. Garraud, M. Robert, C.R. Quetel, J. Szpunar, O.F.X. Donard, *Atomic Spectroscopy*, **1996**, 17(5), 183-185

- [33] J.K. Friel, C.S. Skinner, S.E. Jackson, H.P. Longerich, *Analyst*, **1990**, 115, 269-273
- [34] C.S. Muñiz, J.M. Marchante-Gayón, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Mendel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, 193-198
- [35] R.J. Bowins, R.H. McNutt, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1994**, 9, 1233-1236
- [36] M. Knowles, *Varian Application Notes*, **1987**, AA-76.
- [37] D.A. Becker, D.L. Anderson, R.M. Lindstrom, R.R. Greenberg, K.M. Garrity, E.A. Mackey, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1994**, 179, 149-154
- [38] N.I. Ward, F.R. Abou-Shakra, S.F. Durrant, *Biol. Trace Elem. Res.*, **1990**, 37, 177-187
- [39] U. Tomza, T. Janicki, S. Kossman, *Radiochem. Radioanal. Letters*, **1983**, 58(4), 209-220
- [40] F. Watt, J.P. Landsberg, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1993**, B77, 249-260
- [41] E. Clayton, K.K. Wooller, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1075-1079
- [42] A.J.J. Bos, C.C.A.H. van der Strap, V. Valkovič, R.D. Vis, H. Verheul, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1984**, B3, 654-659
- [43] N. Limič, V. Valkovič, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1987**, B22, 163-165
- [44] W.M. Kwiątek et al., *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1987**, B22, 166-171
- [45] T. Bădică et al., *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1984**, B3, 288-290
- [46] S. Yin et al., *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1993**, B75, 177-179
- [47] X. Zeng et al., *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1987**, B22, 172-175
- [48] V. Valkovič, F. Watt, M. Jaksic, G.W. Grime, J. Wells, J.W. Hopewell, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **1993**, B75, 173-176
- [49] M. Hoenig, *Varian Application Notes*, **1985**, AA-49.
- [50] J. Štupar, F. Dolinšek, *Spectrochim. Acta B*, **1996**, 51, 665-683
- [51] J.J. Progar, J.C. May, T.C. Rains, R.L. Watters, L. Yu, *Biologicals*, **1996**, 24, 87-93
- [52] G. Bagliano et al., *Microchem. J.*, **1981**, 47, 238-251
- [53] C.S. Muñiz, J.M. Marchante-Gayón, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Mendel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 283-287
- [54] A.B.S. Cabezuelo, E.B. González, A. Sanz-Mendel, *Analyst*, **1997**, 122, 573-577
- [55] S. Constantini, R. Giordano, *Aluminium in Chemistry, Biology and Medicine*, M. Nicolini, P.F. Zatta, B. Corain (szerkesztők), **1991**, Raven Press, New York, 21-29
- [56] D.L. Tsalev, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1994**, 9, 405-414
- [57] H.B. Röllin, C.M.C.A. Nogueira, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **1997**, 35(3), 215-222
- [58] M. De Wit, R. Blust, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 515-520
- [59] I.I. Stewart, J.W. Olesik, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 1249-1256
- [60] N. Violante, F. Petrucci, P. D. Femmine, S. Caroli, *Microchem. J.*, **1992**, 46, 199-203
- [61] E. Beccaloni, L. Fornarelli, O. Senofonte, N. Violante, S. Caroli, *Acta Chim. Hung.*, **1989**, 126, 423-428
- [62] S. Caroli et al., *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7, 859-864
- [63] D.E. Shrader, L.M. Voth, L.A. Covick, *Varian Application Notes*, **1983**, AA-31.
- [64] P. Doidge, *Varian Application Notes*, **1982**, AA-25.
- [65] L.M. Voth, *Varian Application Notes*, **1985**, AA-45.

- [66] B. Loescher, *Varian Application Notes*,**1984**,AA-40.
- [67] J. Pybus, *Varian Application Notes*,**1986**,AA-57.
- [68] P.E. Gardiner, M. Stoeppler, H.W. Nürnberg, *Analyst*,**1985**,110,611-617
- [69] J.S. Becker, H.-J. Dietze, *Int. J. Mass Spectrom.*,**2000**,197,1-35
- [70] J.S. Becker, H.-J. Dietze, *Spectroscopy Europe*,**1998**,10/4,14-20
- [71] J.S. Becker, H.-J. Dietze, *J. Anal. At. Spectrom.*,**1998**,13,1057-1063
- [72] R.E. Wolf, Z.A. Grosser, *Atomic Spectroscopy*,**1997**,18(5),145-151
- [73] T.-J. Hwang, S.-J. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.*,**1996**,11,353-357
- [74] K.E. Murphy, P.J. Paulsen, *Fresenius J. Anal. Chem.*,**1995**,352,203-208
- [75] A. Stroh, *Atomic Spectroscopy*,**1993**,14/5,141-143
- [76] M. Patriarca, T.D.B. Lyon, B. McGaw, G.S. Fell, *J. Anal. At. Spectrom.*,**1996**,11,297-302
- [77] C.S. Muñiz, J.M. Marchante-Gayón, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Mendel, *J. Anal. At. Spectrom.*,**1999**,14,1505-1510
- [78] A.B.S. Cabezuelo et al., *Analyst*,**1998**,123,865-869
- [79] I.Karadjova, G. Zachariadis, G. Boskou, J. Stratis, *J. Anal. At. Spectrom.*,**1998**,13,201-204
- [80] M. Wilhelm, H. Idel, *Zbl. Hyg.*,**1996**,198,485-501
- [81] V. Valkovič, N. Limič, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*,**1986**,37,925-930
- [82] V. Zakrgynska-Fontaine et al., *Biol. Trace Elem Res.*,**1998**,61,151-168
- [83] J.F.M. de Kom et al., *Clin. Toxicol.*,**1997**,35(6),645-651
- [84] T. Kraus, K.H. Schaller, J. Angerer, S. Letzel, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*,**2000**,73,61-64
- [85] G.D. Nuyts et al., *The Lancet*,**1995**,346,7-11
- [86] J.J. Moulin, T. Clavel, B. Buclez, G. Lafitte-Rigaud, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*,**2000**,73,323-330
- [87] C.E. Khassouani, R. Soulaymani, Y. Mauras, P. Allain, *Clin. Chim. Acta*,**2000**,302,155-160
- [88] WHO, *Trace Elements in Human Nutrition and Health*,**1996**,Geneva,258-259
- [89] G.V. Iyengar, W.E. Kollmer, H.J.M. Bowen, *The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids*,**1978**,Verlag Chemie,Weinheim, New York
- [90] F. Fischbach, *A Manual of Laboratory Diagnostic Tests*,**1988**,J.B. Lippincott Co.,Philadelphia
- [91] K. Shrestha, A.E. Karuhra, *Archives of Environ. Health*,**1988**,43/6,396-398
- [92] D.L. Ely, R.A. Mostardi, N. Woebkenberg, D. Worstell, *Environ. Res.*,**1981**,25,325-339
- [93] D.E. Ryan, J. Holzbecher, D.C. Stuart, *Clin. Chem.*,**1978**,24/11,1996-2000
- [94] O. Oster, *Clin. Chim. Acta*,**1993**,214,209-218
- [95] K.Y. Hung et al., *Int. J. Art. Org.*,**1997**,20/10,553-556
- [96] E. DeVoto, R.A. Yokel, *Environ. Health Persp.*,**1994**,102,940-951
- [97] N.D. Priest et al., *Human Exp. Toxicol.*,**1998**,17,296-301
- [98] J. Hdez-Jaras, A. Galán, P. Sánchez, *Nephron*,**1998**,78,274-277
- [99] N. Di Paolo et al., *Int. J. Art. Org.*,**1997**,20/10,547-552
- [100] G.F. van Landeghem et al., *Clin. Nephrol.*,**1998**,50/2,69-76
- [101] R. Parry et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*,**1998**,13,1759-1762

[102] A. Montaser, D. Golightly, *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectroscopy*, 1987, VHC Publishers, Inc., New York

[103]

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Papp Lajos professor emeritusnak, témavezetőmnek, és Dr. Varga Zsuzsának, konzulensemnek, hogy munkámat irányították, és mind szakmailag, mind emberileg támogattak.

Köszönöm Dr. Sóvágó Imre professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy diplomamunkámat és doktori értekezésemet is a Szervetlem és Analitikai Kémia Tanszéken készíthessem el.

A kísérleti munkában, speciális mérésekben nyújtott segítségéért köszönet illeti Uzonyi Imrét és Borbélyné Kiss Ildikót, akik a PIXE mérések lebonyolításában voltak segítségemre, Dr. J.S. Beckert és Dr. H.-J. Dietzét, akik egyéves németországi tanulmányutam során az ICP-MS méréseket tették lehetővé, és Dr. Mátyus Jánost, aki a dializált betegek adatainak értékelésében volt segítségemre.

Köszönöm kollégáimnak, Dr. Posta József docensnek, Dr. Braun Mihálynak, Dr. Gáspár Attilának, Kovács Piroska Ph.D. hallgatónak, Nagy István vegyészmérnöknek és Barcsa Gáborné technikusnak a sokoldalú szakmai segítséget, támogatást és az ötleteket, amiket tőlük kaptam.

Köszönöm a DE OEC I. sz. Belgyógyászaton Dr. Varga Zsuzsa laborvezetőnek és a Belgyógyászat dolgozóinak, hogy a kontroll személyektől és a betegektől a mintavételt megszervezték és folyamatosan bonyolították, és az eredmények kiértékeléséhez szükséges klinikai vizsgálatokat elvégezték.

Köszönet illeti Donka András üvegtechnikust és Maglóczki László mechanikai műszerészt a speciális kísérleti eszközök szakszerű, pontos elkészítéséért.

Köszönöm továbbá az OTKA jelen kutatásokhoz nyújtott anyagi támogatását (OTKA T 22739).

Török Lajosnének köszönöm a mindennapi adminisztrációs teendőkkel kapcsolatos önzetlen segítségét.