

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

Ústav klinické biochemie a patobiochemie

**Stanovení stroncia v biologickém materiálu pomocí atomové absorpční
spektrometrie**

Bakalářská práce

Vypracovala:

Anna Horová

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Jiří Kukačka, Ph.D.

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor:

Zdravotní laborant

PRAHA 2008

SOUHRN

Stopové prvky hrají důležitou roli v lidském těle. Studium koncentrací těchto prvků v lidských tkáních se díky dostupnosti moderních technologií věnuje dnes daleko více pozornosti ve vztahu k poruchám zdraví člověka. Jedním z těchto prvků je i stroncium. Zatím nebylo zjištěno, že jeho nedostatek způsobuje vážné zdravotní potíže. Ovšem tento prvek je potenciálně toxický, zvláště při dlouhodobé expozici. Na druhé straně jeho účinky v malých dávkách jsou příznivé na kostní tkáň, zvláště na kosti pacientů, kteří trpí osteoporózou. Proto se v poslední době stal součástí účinného léku proti osteoporóze – stronciumranelátu.

Cílem této práce bylo zavést vhodnou metodu pro stanovení stroncia a vyšetřit Sr:

- a) v plazmě a séru pacientů léčených stronciumranelátem
- b) v séru dětí ve věku do 1 roku
- c) ve venózní a arteriální pupečnickové krvi
- d) v jaterní tkáni laboratorního potkana

Byla zavedena metoda pro stanovení Sr v biologickém materiálu pomocí plamenové i bezplamenové AAS. Bylo zjištěno, že plazmatické koncentrace Sr pacientů léčených stronciumranelátem se pohybují od 30 μg/l do 17757 μg/l, odpad moči od 0,17 mg/24 hod do 232 mg/24 hod. Z naměřených hodnot sérových koncentrací Sr byly stanoveny referenční meze pro stroncium u dětí do 1 roku. Průměrná koncentrace ve venózní pupečnickové krvi byla 54,17 μg/l a v arteriální krvi 56,69 μg/l. Průměrné koncentrace stroncia v játrech byla stanovena $2,14 \cdot 10^{-5}$ μg/mg vlhké tkáně. Navíc byla stanovena koncentrace metalothioneinu v játrech, bílkoviny podílející se na metabolismu některých stopových prvků.

Vzhledem k málo zdokumentované chronické toxicitě stroncia by mělo monitorování jeho plazmatických koncentrací být zavedeno u pacientů léčených stronciumranelátem. Koncentrace stroncia v krvi novorozenců a kojenců je ovlivněna potravou a jinými enviromentálními faktory.

SUMMARY

Trace elements play an important role in human body. Thanks to the availability of modern technology, more and more attention is being paid to studying the concentrations of these elements in human tissue with respect to health disorders in people.

Strontium is one of such elements. It has not yet been proved that its deficiency may cause serious health problems. However, this element is potentially toxic, especially after prolonged exposure. On the other hand, in low doses it has particularly favourable effects on the bone tissue, particularly in patients suffering from osteoporoses. This is why it has recently become one of the component used in an effective medicine - strontium ranelate – to treat osteoporoses.

The aim of this theses was to introduce a method suitable for determining strontium concentrations and to determine Sr in

- a) plasma and serum of patients treated with strontium ranelate
- b) serum of children up to the age of one year
- c) venous and arterial umbilical blood
- d) the liver tissue of laboratory rat

A method of determining Sr in biological matter by means of flame and flameless AAS has been introduced. Plasmatic Sr concentrations in patients treated with strontium ranelate were found at levels from 30 µg/l to 17757 µg/l, urinal residue ranged from 0.17 mg/24 hour to 232 mg/24 hour. Based on the values of Sr serum concentrations, reference limit Sr concentrations were determined for children up to the age of one year. Average concentrations in venous umbilical blood were 54.17 µg/l and in arterial umbilical blood 56.69 µg/l. Average strontium concentrations in the liver were determined at 2.14×10^{-5} µg/mg of moist tissue. On top of that, the concentration of metallothionein in the liver, the protein participating in the metabolism of certain trace elements, was also determined.

With regard to the little-documented chronic toxicity of strontium, monitoring its plasmatic concentrations should be introduced in patients treated with strontium ranelate. Strontium concentrations in the blood of newly born babies and infants are influenced by food and other environmental factors.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

PODĚKOVÁNÍ

Na předložené bakalářské práci jsem pracovala na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole pod vedením ing. Jiřího Kukačky, Ph.D.

Děkuji svému školiteli Ing. Jiřímu Kukačkovi, Ph.D., za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a připomínek.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Tošnerové za všestrannou pomoc a ochotu při řešení problému spojených s prací v experimentální části a za předané zkušenosti.

Zvláštní poděkování patří i ostatním pracovníkům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 Chemie stroncia.....	2
2.2 Zdroje stroncia.....	3
2.3 Nedostatek stroncia.....	4
2.4 Toxicita stroncia.....	4
2.5 Střevní absorpce stroncia.....	5
2.6 Stroncium ve svalech.....	6
2.7 Řízení množství stroncia v organismu.....	6
2.8 Role stroncia v endokrinologii.....	8
2.9 Stroncium v kostech.....	8
2.10 Metalothioneiny.....	12
2.11 Analytické metody.....	13
2.12 Referenční hodnoty laboratorních vyšetření.....	16
3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	19
4.1 Charakterizace, odběr a zpracování biologického materiálu.....	19
4.2 Použité chemikálie a materiál.....	20
4.3 Přístroje.....	21
4.4 Stanovení stroncia atomovou absorpční spektrometrií.....	22
4.5 Zpracování naměřených dat.....	25
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	26
5.1 Statistické zpracování dat.....	26
5.2 Stanovení stroncia u pacientů léčených stronciumranelátem.....	26
5.3 Stanovení koncentrace stroncia u dětí v séru.....	28
5.4 Stanovení stroncia v pupečnickové krvi.....	30
5.5 Stanovení stroncia v jaterní tkáni.....	32
5.6 Stanovení metalothioneinu v jaterní tkáni.....	32
6. ZÁVĚR.....	34
7. PŘEHLED LITERATURY.....	35

8. SEZNAM ZKRATEK.....	37
-------------------------------	-----------

1. ÚVOD

Stroncium je prvek, který dříve přitahoval v lidské biologii a patologii méně pozornosti, než např. vápník a hořčík. Tyto prvky patří do stejné skupiny periodického systému, z toho vyplývají jejich podobné vlastnosti i účinky. Zájem o stroncium z hlediska biologické role v organismu začal vzrůstat až po objevu a uplatnění látky stronciumranelátu (obr.1). Tento lék napomáhá ke snížení výskytu zlomenin u osteoporotických pacientů. Poznatky o stronciu začaly být získávány v době, kdy se studiu stopových prvků začalo věnovat obecně více pozornosti. Studium stopových prvků v lidských tkáních se v současnosti opět setkává se zvýšeným zájmem, a to především díky dostupnosti moderních senzitivních analytických technologií v laboratorní medicíně. Česká republika, jako většina středoevropského regionu, je na většinu stopových prvků chudá, a proto je nutné, aby se věnovala tomuto problému větší pozornost. Dalšími impulzy ke studiu této problematiky jsou zkušenosti s dialyzačními roztoky, zvláště v rozvojových zemích, kde docházelo ke kontaminaci pacientů během dialýzy. Jednotlivé typy renální osteodystrofie mají spojitost se změnami koncentrací stopových prvků v kostech, tedy i stroncia.

Jednotlivé poznatky o stronciu se v literatuře liší. Zdravotní rizika stroncia jsou zmiňována pouze v souvislosti s radioaktivním izotopem ^{90}Sr , který vzniká při radioaktivním rozpadu uranu. Ovšem o jiných izotopech stroncia a jejich vlivu na organismus se ví stále málo.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chemie stroncia

V roce 1787 našel skotský chemik a mineralog William Cruishank v olověných dolech poblíž města Stroncianu (Skotsko) nový zajímavý minerál. V roce 1790 ukázal irský chemik Adair Crawford, že tento minerál je sloučeninou nového prvku. Nový nerost (stroncianit) byl uhličitanem strontnatým (SrCO_3). Nový prvek v minerálu byl nazván stronciem. Samotný prvek byl získán až o řadu let později. Stroncium izoloval sir Humphry Davy elektrolýzou směsi obsahující chlorid strontnatý a oxid rtuťnatý až v roce 1808.

Stroncium patří mezi kovy alkalických zemin. Je poměrně měkký, lehký, reaktivní kov, který se svými vlastnostmi více podobá vlastnostem alkalických kovů. Není tolik reaktivní jako alkalické kovy, ale přesto je jeho reaktivita natolik vysoká, že může být dlouhodobě uchováváno pouze pod vrstvou alifatických uhlovodíků (petrolej, nafta), s nimiž nereaguje. Soli stroncia barví plamen červeně. Volné stroncium se v přírodě nevyskytuje, protože kovové stroncium snadno oxiduje na oxid strontnatý, který má žlutou barvu. Stroncium je známo z minerálů celestit (SrSO_4) a stroncianit (SrCO_3). Přírodní stroncium se skládá ze 4 stabilních izotopů : ^{84}Sr (0,56%), ^{86}Sr (9,86%), ^{87}Sr (7,02%) a ^{88}Sr (82,56%). Izotop ^{87}Sr v přírodě vzniká beta rozpadem izotopu ^{87}Rb , proto se mu říká radiogenní. Pomocí poměrů množství izotopů ^{87}Sr , ^{86}Sr a ^{87}Rb se dá odhadnout i stáří Vesmíru. Prvky 2. skupiny periodického systému, do které stroncium patří spolu s Ca a Mg, vytváří v biologických tekutinách dvojmocné kationty a mají rozdílné stupně proteinové vazby v séru nebo plazmě. Vazba stroncia na proteiny v séru nebo plazmě je stejná a i ve stejném pořadí jako u Ca. Další důležité rozdíly mezi Mg, Ca a Sr jsou popsány v **tabulce 1** [1].

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti biologicky významných prvků 2. skupiny periodického systému: hořčík, vápník a stroncium a jejich distribuce v těle u 70 kg člověka

Prvek	Protonové č.	Atomová hmotnost	Množství v těle (g)	% z tělesné hmotnosti
Mg	12	24,32	19	0,027
Ca	20	40,08	1000	1,4
Sr	38	87,63	0,32	0,00044

Stroncium je stopový prvek, který se v lidském těle vyskytuje ve velmi malém množství. Pokud vezmeme běžného člověka, bilance Sr v mg/den je: příjem potravou a tekutinami (1,9 mg); minus ztráty močí (0,34 mg); výkaly (1,5 mg); další ztráty např. potem (0,02 mg). Radioaktivní izotopy Sr jsou používány pouze pro fyziologické studie nebo diagnostické účely. Charakteristiky radioaktivních izotopů Sr jsou shrnuty v **tabulce 2** [1].

Tabulka 2

Radioizotop	Poločas rozpadu	Charakteristika emitov. záření	Použití
⁸⁵ Sr	64,8 dní	0,514 keV gamma záření	Pro metabolické studie: celotělová scintigrafie
⁸⁹ Sr	50,5 dní	1488 keV beta záření	Léčba kostní bolesti v důsledku metastáz z prostatického karcinomu
⁹⁰ Sr	28 let	546 keV beta záření, 2288 keV beta záření	Kontaminace biosféry z testů atomových bomb

Některé radioizotopy jsou používány v medicínském výzkumu. Slouží jako vhodné nástroje pro kinetické studie, náhradu za Ca v kinetických studiích, protože tyto dva kovy se v lidském těle chovají podobně. Oba se silně usazují v kostech. Nicméně biologické rozdíly mezi těmito prvky existují, z části vysvětlitelné větší velikostí molekuly Sr. Společné transportní dráhy pro Ca a Sr byly popsány pro mnoho orgánů. Sr soutěží s Ca o střevní absorpci, renální tubulární reabsorpci atd. Radioaktivní ⁹⁰Sr je potenciálně nebezpečné pro lidské tělo, protože se hromadí v kostech. Vysvětlením může být, že radiostroncium poškozují kapiláry a tím likviduje krevní oběh v kostech. Afinita stroncia k chelatačním činidlům není vyšší než afinita vápníku, např. jestliže je podáno NaCa₂EDTA, tak je chelatováno jen velice málo stroncia [1].

2.2 Zdroje stroncia

Stroncium tvoří 0,02 – 0,03 % zemské kůry. Jeho koncentrace v půdě a pitné vodě se geograficky liší. U nás činí 0,001 mg/l v půdě a 39 mg/l v pitné vodě. V USA je koncentrace Sr v pitné vodě < 1 mg/l. Běžná strava obsahuje 2 - 4 mg Sr/den, většinou pochází ze zeleniny a obilovin. V rostlinách koncentrace Sr odráží koncentraci obsaženou v půdě, která je nižší než u vápníku. Podle některých odhadů je relativní množství stroncia v zemské kůře okolo 8 mg Sr/1000 mg Ca. Stroncium je přírodní růstový stimulant a může u některých rostlin nahradit Ca. Rostliny obvykle obsahují stejný poměr Sr/Ca jako jejich odpovídající půdní

extrakty a např. v Anglii se tento poměr pohybuje mezi 1,4-5,7 mg Sr/1000 mg Ca. Nejvyšší hodnoty byly nalezeny v extraktu ze dvou písčitých, kyselých půd s nízkým obsahem Ca. Ukázalo se, že poměr Ca/Sr ve tkáních a tělních tekutinách odráží poměr Ca/Sr ve stravě [1].

2.3 Nedostatek stroncia

Neprokázalo se, že stroncium je prvkem, který by při nedostatku u člověka způsobil vážné zdravotní potíže. Naopak v rostlinách může podporovat růst. Tvorba zubního kazu je nepřímou závislá na hladině Sr ve vodě, plaku a sklovině. Podávání Sr ve středních dávkách je prevence zubního kazu u potkanů. Pokud se experimentálně podávalo Sr ve formě stronciumranelátu pokusným zvířatům, zvýšil se u nich obsah Ca v kostech [1].

2.4 Toxicita stroncia

U člověka nebyly popsány toxické symptomy způsobené předávkováním stronciem. Nicméně intravenózní podání vysokých dávek Sr způsobuje hypokalcemii díky zvýšenému renálnímu vylučování Ca. Toxické účinky Sr byly intenzivně studovány u hospodářských zvířat. Selata krmená 6 700 ppm Sr a 0,16 % Ca trpěla inkoordinací a slabostí následovanou posterální paralýzou. Dospělé slepice se zdají být odolnější, jejich váha a produkce vajec nebyly ovlivněny až do krmné koncentrace Sr 30 000 ppm. Bylo zjištěno, že vysoká koncentrace stroncia v potravě byla provázána nerozpustnými fosforečnými stroncia a to vedlo k nedostatku fosforu a rachitidě. Jediná chemikálie obsahující stabilní stroncium, která je považována za zdraví škodlivou už v malém množství, je chroman strontnatý. Toxicita je způsobena chromem, který je genotoxický karcinogen [1].

2.4.1 Toxicita stroncia a renální insuficience

Studie ukázaly vztah mezi hromaděním stroncia v kostech a osteomalácií. Bylo zjištěno, že hliník se chová stejně jako stroncium. U pacientů s renální insuficiencí může dlouhodobý příjem hlinitých solí vyvolat známky intoxikace. Charakteristickým příznakem je též osteomalacie. Při podávání stroncia se zjistilo, že jeho účinek závisí na dávce. Účinek se projevil hlavně mineralizací kompaktních a spongiózních kostí. Několik studií na zdravých krys ukázalo, že vysoké dávky stroncia > 8 mmol/kg/den, vyvolaly změny mineralizace. U krys s chronickým renálním selháním, vyvolal SrCl₂ o koncentraci 10 g/l mineralizační defekt se 160x vyšším obsahem kostního stroncia, než v kostech u kontrolních krys.

Hromadění kovů v kostech může být synergické (tzn. více kovů společně vyvolá větší účinek, než kdyby působil každý sám). Obsah hliníku v kostech byl vyšší u zvířat, která přijala hliník a stroncium současně, než u těch, kterým byl podáván pouze hliník. Další histomorfologické studie ukázaly, že u zvířat léčených současně hliníkem a stronciem byla více snížena rychlost kostní tvorby než u zvířat léčených pouze stronciem samotným. V dialyzačních centrech v rozvojových zemích, byla zjištěna korelace dialyzačních tekutin s obsahem stroncia v séru. Tento zjištěný fakt se objevoval tam, kde se užívalo koncentrátů na bázi acetátu. Kde se používaly bikarbonáty, hladina stroncia zvýšena nebyla. Použití dialyzační tekutiny na bázi acetátu může být příčinou pozdější intoxikace stronciem. Podstatnou roli v hromadění stroncia hrají i další faktory, které zahrnují např. délku vystavení (po dobu z 10. na 25. den, kdy byly krysy vystaveny působení stroncia, se jeho obsah ve femuru krys zdvojnásobil), koncentraci vápníku v séru, užití vitamínu D jako doplněk stravy a konzumaci mořských plodů [2].

2.4.2 Absorpce stroncia bez akutní toxicity

Stroncium je používáno nejen v lékařství, ale i v průmyslu. Stroncium má uplatnění ve sklářském průmyslu (na výrobu obrazovek barevných televizorů). Dále se používá při výrobě feritových magnetů a k rafinaci zinku.

V jednom z ojedinělých případů je dokumentován příjem velkého množství stroncia bez akutní toxicity. Do nemocnice byl přivezen 22 letý muž, schizofrenik, který rozdrtil a požil magnety, které byly později identifikovány jako stronciumferrit. Kromě sluchových halucinací, které uváděl, neměl žádné jiné významné příznaky toxicity. Byl proveden výplach střev. Přitom byla měřena hladina stroncia v krvi a moči. Počáteční hladiny stroncia v krvi a moči byly 2 900 µg/l a 15 000 µg/l (referenční rozmezí pro moč: < 240 µg/l). O týden později klesla hladina stroncia v moči na 370 µg/l. Přes zjevnou absorpci stroncia ferritu, nejevil pacient žádné známky intoxikace [3].

2.5 Střevní absorpce stroncia

Upřednostňování vápníku před stronciem se projevuje ve fyziologických procesech v následujících funkcích: gastrointestinální absorpce, renální vylučování, placentární transfer. Stroncium se špatně vstřebává v gastrointestinálním traktu. Střevní absorpce stroncia u krys se snižuje s jejich věkem, ale zda-li je tomu tak u lidí, je dosud neznámé. Vitamin D

podporuje střevní absorpci Sr, zatímco Ca ji inhibuje. Laktóza a další polysacharidy mohou podpořit absorpci jak Sr tak i Ca.

Z experimentů na zvířatech bylo zjištěno, že většina z podaného stroncia je vstřebávána z jejunu, a to sice 62 % z tekuté dávky a 88 % z pevné dávky. Absorpční poměr $^{85}\text{Sr}/^{45}\text{Ca}$ je 0,6 – 0,7. Přednostní absorpce Ca může být přisuzována poměrně malé velikosti atomu Ca. Zatímco vápník je schopen pohybu z mukózní na serózní stranu proti koncentračnímu gradientu, zdá se že tato skutečnost neplatí pro stroncium [1].

2.6 Stroncium ve svalech

V kardiomyocytech u potkanů vápník přímo aktivuje uvolněné stroncium ze sarkoplasmatického retikula. Stroncium blokovalo uvolnění intracelulárního Ca inhibující acetylcholinem podněcenou kontrakci v kočičích svalových buňkách. Aktivace hladkého svalstva je běžně doprovázena zvýšením nitrobuňkové koncentrace Ca^{2+} [1].

2.7 Řízení množství stroncia v organismu

Stroncium a vápník zdánlivě sdílejí společnou tubulární transportní dráhu v renálních tubulech. Sr v poškozených renálních proximálních tubulárních buňkách inhibuje PTH-dependentní cyklický AMP produkt jako Ca, v koncentraci nad 10 mM. Renální clearance stroncia je 3x vyšší než vápníku, možná závislá na menší tubulární reabsorpci, která by mohla být způsobena větší velikostí atomu stroncia [1].

Normální ledviny eliminují většinu ze vstřebaného Sr. Jsou primárním zdrojem eliminovaného Sr, a proto pacienti s renální insuficiencí mají větší riziko hromadění tohoto kovu v těle. Koncentrace Sr je také zvýšena v séru uremických pacientů [1].

2.7.1 Množství stopových prvků v kostech pacientů s konečným stadiem renálního selhání

U uremických může docházet k narušení metabolismu stopových prvků kvůli: a) snížení renální funkce, b) proteinurii, vedoucí ke ztrátě prvků, které se váží na protein, c) změnám v gastrointestinální absorpci následkem změn např. v metabolismu vitamínu D a d) dialýze. Koncentračním gradientem mezi ultrafiltračním množstvím určitého prvku v séru a jeho koncentrací v dialyzační tekutině, lze některé stopové prvky odstranit, zatímco jiné prvky přítomné v dialyzačním roztoku mohou pacienty kontaminovat. S výjimkou Al a Fe, je známo

jen málo o hromadění nebo nedostatku stopových prvků v kostech pacientů s konečným stádiem renálního selhání léčených dialýzou. O změnách stopových prvků v kostech dialyzovaných pacientů a spojitostech jednotlivých typů renální osteodystrofie se zvýšenými nebo sníženými kostními koncentracemi stopových prvků se ví jen velmi málo. U pacientů s renálním selháním přijatých do hemodialyzačního programu byly analyzovány stopové prvky v kostních biopsiích. Srovnáním poměru stopový prvek/vápník, byly nalezeny významně vyšší hodnoty pro kostní Cr/Ca, Al/Ca, Zn/Ca, Mg/Ca a Sr/Ca. Mezi všemi typy renální osteodystrofie byly zjištěny zvýšené koncentrace hliníku, olova a stroncia a poměry Sr/Ca a Al/Ca u dialyzovaných pacientů s osteomalácií, v porovnání s jinými typy renální osteodystrofie. Kromě toho, koncentrace několika stopových prvků v kostech navzájem významně korelovala. Kostní Al koreloval s dobou dialýzy, kdežto kostní Fe, Mg a Sr a hliník spíše souvisely s věkem pacienta. Koncentrace kostních stopových prvků nebyla závislá na příjmu vitamínu D ani na pohlaví pacienta [4].

2.7.2 Řízení homeostázy

Ze studií na zvířatech vyplývá, že Sr může nahradit Ca v mnoha fyziologických procesech. Svalová koncentrace a srážení krve jsou vyvolané Sr stejně jako Ca, ale v menší míře. Zdá se, že kdekoliv je aktivní přenos biologickými membránami např. při gastrointestinální absorpci, ledvinovém vylučování, při laktaci a přes stěnu placenty, Ca je přenesen snáz než Sr. Narozdíl od Ca, Sr není řízeno homeostázou ve smyslu celkového množství v těle a v biologických tekutinách (koncentrace Ca v krvi je udržována velmi přísným mechanismem). To bylo známo již brzy v 60. letech před věkem těchto látek : kalcitoninu a metabolitů aktivního vitamínu D tj. 25-hydroxycholecalciferolu nebo 1,25-dihydroxycholecalciferolu. Hladina Sr může být přímo ovlivněna vápníkem a hormony. Je dobře známo, že u savců extracelulární tekutiny mají milimolární koncentraci Ca a mikromolární koncentraci Sr. V tomto vysokém poměru Ca/Sr nemůže Sr konkurovat Ca a během evoluce nebylo potřeba vytvořit separační mechanismy specifické pro Ca a Sr. Na molární úrovni vypadá Sr méně biologicky aktivní než Ca a toxicita Sr není dobře zdokumentována. Parenterální podání Sr umožňuje podávat daleko větší dávky Sr, aniž by to poškodilo orgány nebo funkce. Může to být pravděpodobně tím, že intracelulární Sr je přísněji regulováno než extracelulární, ale o tom se ví jen málo [1].

2.8 Role stroncia v endokrinologii

V mnoha farmakologických studiích na tkáňových kulturách bylo prokázáno, že užití stroncia v izolovaných buňkách popř. orgánech dokáže do značné míry nahradit funkci vápníku. Následující příklady nám toto dokládají:

- A. Stroncium podporuje sekreci insulínu, jakožto odpověď na glukózu v izolovaných buňkách (systémech) pankreatických ostrůvků, podobně jako vápník, i když v menší míře.
- B. Stroncium, podobně jako ostatní dvojmocné a trojmocné ionty, omezuje vápníkem nízko stimulovanou produkci PTH, ale nikoliv ve fyziologických koncentracích [1].

V těle se stroncium chová velice podobně jako Ca. Příklady, jež to dokládají:

- A. Farmakologické dávky Sr u prasat zvyšují sekreci kalcitoninu po infuzi do *arterie thyroideae*.
- B. Parathyroidektomie u krys nemá za následek pouze hypokalcemii, ale i hypostronciemii.
- C. Glukagon, který podněcuje sekreci kalcitoninu, vyvolává u potkanů hypokalcemii i hypostroncinemii. Minimální hladina sérového Ca a sérového Sr byla stejná třetí den po podání kalcitoninu nebo glukagonu [1].

2.9 Stroncium v kostech

Množství Sr v kostře je pouze 0,035 z jejího obsahu Ca. Radioaktivní izotop stroncia ^{85}Sr je z krve odstraněn skoro ihned po aplikaci. ^{85}Sr prochází stěnami Haversových kapilár pomocí difuze, a tak se dostává do kostních extracelulárních tekutin. Podávané stroncium je téměř výhradně ukládáno v kostech. Na, Pb a Sr mohou nahradit pozici Ca v apatitu (fosforečnan vápenatý). Radiostroncium bylo používáno jako vyhledávač vápníku v kinetických studiích. Ačkoliv se radiokalcium a radiostroncium chovají odlišně, obě tyto látky velice dobře pronikají do kostí, kde se usazují. Rozdíly byly zaznamenány v jejich vylučování močí a na změnách plazmatické koncentrace po intravenózních podáních do téhož jedince. Sr a Ca se chovají podobně, ale ne identicky. To se týče střevní absorpce, ledvinového vylučování a hromadění v kostech. Zásadním rozdílem je, že celkové množství Sr v kostře je malé v porovnání s Ca. Na rozdíl od Ba a Ra, které jsou vylučovány hlavně výkaly, Ca a Sr jsou v případě intravenózního podání ve velkém množství vylučovány

ledvinami. Z hlediska dlouhodobého pohledu se chovají tyto dva prvky, po začlenění do kostí, téměř stejně [1].

Morohashi a kol. studovali závislost účinku stroncia na dávce při perorálním podání krysám. Výsledky naznačily, že stroncium v dávkách menších než 175 $\mu\text{mol}/\text{den}$ nemá toxický účinek na obsah vápníku v kostech nebo na jeho metabolismus. Podání nadměrných dávek stroncia snížilo střevní absorpci vápníku a vyvolalo hypokalcemii [5]. V jiné studii na krysách po ovariectomii bylo prokázáno, že dávka stroncia 87,5 $\mu\text{mol}/\text{den}$ může zabránit změnám v kostním obratu zvýšených nedostatkem estrogenů [6].

2.9.1 Rachitogenetický účinek stroncia

Jak bylo prokázáno u hospodářských zvířat, stroncium je méně toxické než vápník. Vysoké množství stroncia může způsobit u experimentálních zvířat kostní změny podobné rachitidě, obzvláště když je nízký příjem vápníku. To je způsobeno narušením intestinální absorpce vápníku a snížením renální produkce 1,25-dihydroxycholecalciferolu. Vápník a stroncium sdílejí ve střevě společnou absorpční dráhu. Tato soutěživá inhibice byla demonstrována v izolovaných částech střeva. Bylo ukázáno, že proteiny vázající vápník váží stroncium v menší míře než vápník a že stroncium inhibuje v ledvinách 1-hydroxylázu, zmenšuje se tím produkce 1,25-dihydroxyvitaminu D. Vitamin D u kuřat, stejně dobře jako jeho hydroxyderivát, po vysokých dávkách přijatého stroncia ztrácí antirachitickou aktivitu, ale 1,25-dihydroxyvitamin D udržuje schopnost střevního epitelu syntetizovat proteiny vázající vápník. Strava s vysokým obsahem vápníku stejně tak jako strava s vysokým obsahem stroncia u gravidních myší snížila obsah proteinů vázajících vápník ve střevě matky a v placentě. To vedlo k hypomineralizaci fetální kostry. Mladší zvířata jsou citlivější na nadbytek stroncia než starší zvířata a nepřiměřený příjem vápníku a vitaminu D zvyšuje škodlivý účinek stroncia na kosti.

Význam stroncia v lidské výživě zkoumali např. Ozgure a jiní. Našli, že ve dvou tureckých regionech, kde množství stroncia v půdě bylo velice odlišné, byla prevalence rachitidy vysoká: v regionu 1 byl obsah stroncia okolo 350 ppm a v regionu 2 byl menší než 350 ppm. V regionu 1 byla prevalence rachitidy 31,5 % a v regionu 2 19,5 %. Z toho vyplývá, že vysoká koncentrace stroncia v půdě může způsobit rachitidu [1].

Přímý účinek vysokých dávek stroncia v kostech *in vitro* byl demonstrován Verbeckmoesem a kol. Našli důkaz o tom, že vysoké dávky stroncia v médiu tkáňových

kultur způsobuje nedostatečnou tvorbu hydroxyapatitu, tedy obdobný jev jako u klinické osteomalacie dialyzovaných pacientů [1].

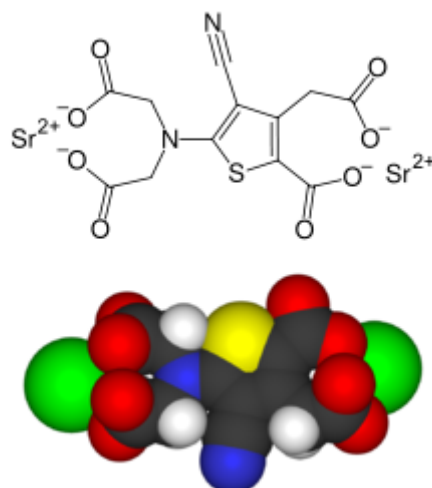
2.9.2 Antiosteoporotický účinek stroncia

Nízká hladina stroncia byla zaznamenána ve stehenní hlavici, v které je nízká frekvence zlomenin. Shorr a Carter ukázali, že po podání nízké dávky laktátu stroncia je ukládání vápníku v kostech vyšší, než když je vápník podán bez stroncia. O pár let později se prokázalo, že laktát stroncia snižuje bolesti u pacientů s osteoporózou. Tomuto pozorování nebyla věnována pozornost právě proto, že byl předtím popsán rachitogenetický účinek vysokých dávek stroncia. Veškeré výzkumy se několik let soustředily na výzkum škodlivých účinků radioaktivních izotopů stroncia a jeho příznivým účinkům taková pozornost věnována nebyla [1].

Poslední výzkumy ukázaly, že stronciumranelát snižuje kostní resorpci a udržuje tvorbu kosti *in vivo*, zvyšuje vertebrální kostní obsah bez mineralizačních defektů a zvyšuje kostní buněčnou replikaci a tvorbu kostní hmoty *in vitro*. Boivin a jiní studovali biodistribuci stroncia po aplikaci stronciumranelátu opicím pomocí rentgenové mikroanalýzy. Změny v kostní krystalové jednotce byly zhodnoceny odchýlením rentgenového záření a Ramanovou mikrospektroskopií. Stroncium bylo inkorporováno do kostního minerálu trabekulární a kompaktní kosti, hlavně do nově tvořené kosti. Když bylo podávání stronciumranelátu zastaveno, koncentrace stroncia v kostech se výrazně snížila. Nebyly pozorovány žádné změny v krystalové mřížce nebo v krystalové struktuře. Minimálně 1 ion vápníku z 10 byl nahrazen jedním iontem stroncia v každém krystalu [1].

2.9.3 Stronciumranelát

Stronciumranelát (obr.1) je schválený pro léčbu osteoporózy ve většině zemí Evropy, ale ještě není schválený v USA. Stronciumranelát je vyráběn jako lék francouzskou společností Servier pod názvem Protelos. Molekula stronciumranelátu je spojena ze dvou atomů stabilního stroncia a z jedné molekuly kyseliny ranelové. Je snadno rozpustná ve vodě a může být vstřebána do těla.



[distrontium 5-[bis(2-oxido-2-oxoethyl)amino]-4-cyano-3-(2-oxido-2-oxoethyl)thiophene-2-carboxylate] [7]

Obrázek 1: Molekula stronciumranelátu

Přesný mechanismus účinku stronciumranelátu dosud není znám. Stronciumranelát zvyšuje replikaci kostních buněk a utváření kostí *in vivo*. Snižuje kostní resorpci (vstřebávání kostní tkáně). Chová se jako agonista osteoblastů. Stimuluje vápenaté receptory a vede k diferenciaci preosteoblastů na osteoblasty, které zvyšují kostní tvorbu.

Stronciumranelát významně snižuje riziko fraktur vertebrálních obratlů u postmenopauzálních osteoporotických žen s nebo bez předchozích zlomenin. Také snižuje riziko fraktur kyčlí a zvyšuje hustotu kostních minerálů. Účinek není závislý na hladině parathyrinu a vitamínu D. Léčbu stronciumranelátem indikuje internista, ortoped, revmatolog, endokrinolog a gynekolog pro pacientky s komplikovanou osteoporózou a s osteoporotickou frakturou. Dále je indikován při kontraindikaci bisfosfonátů a raloxifenu, u pacientů netolerujících jinou antiresorpční terapii nebo při projevech nežádoucích účinků jiné terapie. Léčba delší než 2 roky je indikovaná pouze u prokazatelné zástavy úbytku kostní hmoty. Kontraindikace stronciumranelátu je při přecitlivělosti na účinnou látku, těžké poruše funkce ledvin (clearance kreatininu pod 30 ml/min) a při predispozici k trombembolizmu. Většina nežádoucích účinků se projevuje nauzeou, průjmem, bolestí hlavy a ekzémem. Může dojít ke zvýšení hodnot jaterních transamináz a zvýšení rizika venózního trombembolizmu.

Tetracyklinová antibiotika a chinolonová chemoterapeutika mohou tvořit špatně vstřebatelné komplexy se stronciem. Obvyklá dávka strontiumranelátu je 2 g denně, nejlépe večer alespoň dvě hodiny po večeři [8].

2.10 Metalothioneiny

V roce 1957 Margoshes a Vallee izolovali z ledviny koně nízkomolekulový protein, který vykazoval vysokou afinitu ke kadmii a obsahoval vysoký počet triolových skupin. Díky vysokému obsahu kovu a neobvyklé bioanorganické struktuře byl zařazen mezi metaloproteiny [9].

Dnes je možno charakterizovat metalothioneiny jako superrodinu neenzymatických polypeptidů, s malou molekulovou hmotností v rozmezí 6 až 7 kDa a s vysokým podílem síry a kovů. *In vivo* MT váží Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} nebo Hg^{2+} , zatímco *in vitro* jsou schopny vázat navíc Ag^+ , Bi^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} a Tc^{4+} . Nicméně hlavním vázaným kovem za fyziologických podmínek je zinek. MT se většinou skládají z 60 až 68 aminokyselinových zbytků a ve své centrální části obvykle obsahují dvacet molekul cysteinu, přičemž nejčastěji se opakujícím motivem je cystein (C) – serin (S) – cystein (C). Aromatické aminokyseliny v primární struktuře těchto látek obvykle chybí. Všechny přítomné cysteiny jsou v redukované podobě a koordinované s ionty kovu, přičemž vytvářejí metalothiolátové klastry [10]. Molekula MT je tvořena dvěma vazebnými doménami (α , β), které jsou složeny z cysteinových klastrů. Tyto klastry existují v obou lobulárních doménách. Domény jsou k sobě vázány krátkým polypeptidovým úsekem bohatým na lysin. α -doména na svém C-konci obsahuje 11 cysteinů a je schopna vázat 4 divalentní nebo 6 monovalentních kovů, zatímco N-koncová doména zahrnuje 9 cysteinů schopných vázat 3 divalentní nebo 6 monovalentních kovů. Pokud se kovové ionty naváží na apothionein, polypeptidový řetězec se okamžitě svine do dvou nativních třírozměrných triolových klastrů umístěných v každé z domén. Pouze v α -doméně je jediná krátká oblast se sekundární strukturou (α -helix) a to tehdy, pokud je protein plně obsazený divalentními (nikoliv monovalentními) kovy [9].

Biologická funkce metalothioneinů

Metalothionein má mnoho biologických funkcí. Mezi ty hlavní patří funkce 1) imunoregulační 2) neuroprotektivní 3) metaloregulační 4) detoxikační (vychytávání volných kyslíkových radikálů, eliminace těžkých kovů z organismu). Zájem o MT však vzrůstá díky

tomu, že je to perspektivní onkomarkr. Mnoho studií prokázalo, že se MT vyskytuje nebo že je jeho syntéza zvýšena v normálních proliferujících buňkách a nádorových buňkách. Byl prokázán přímý vztah mezi expresí MT proteinu a agresivním neoplastickým růstem buněk. Díky své nukleofilitě MT chrání buňky před cytotoxickým efektem elektrofilních protinádorových léčiv [11]. Současné studie poukazují na to, že zvýšená exprese MT v buňkách indukuje antiapoptotický efekt a nedostatek MT v buňkách s chybějící syntézou MT zvyšuje jejich náchylnost k programované smrti poté, co jsou vystaveny působení protinádorových léků [12]. MT hraje důležitou roli v procesech detoxikace těžkých kovů. Zároveň existují práce dokazující jeho schopnost vylučovat reaktivní kyslíkové radikály, částečně i hydroxylové radikály. MT byl zařazen k potenciálním prognostickým markerům invazivních duktálních karcinomů mamy, kůže, cervixu a pankreatu [11]. Zvýšená buněčná proliferace nebo porucha buněk uskutečnit apoptózu je považován za hlavní faktor maligních procesů. Vysoká exprese MT je příčinou chemorezistence v léčbě mnoha typů nádorových onemocnění.

Analytických metod pro citlivou analýzu MT není v současné době mnoho. Většina z nich vyžaduje velmi složitou přípravu vzorku, náročnou a drahou instrumentaci. Elektrochemická analýza metalothioneinů představuje jeden z vhodných analytických nástrojů pro detekci v biologických vzorcích. Analýza probíhala elektrochemickou metodou založenou na Brdiczkově reakci (v přítomnosti proteinů obsahujících síru, vzniká polarografický signál).

2.11 Analytické metody

V klinických laboratořích se pro stanovení stroncia používá **atomová absorpční spektrofotometrie** (viz. metodika).

2.11.1 Další metody ke stanovení stroncia

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass spektrometry – MS) je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi (ionizace vzorku nastává zpravidla nárazem prudce letících elektronů nebo je využita chemická ionizace, kdy ionty vznikají chemickou reakcí) a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z [13].

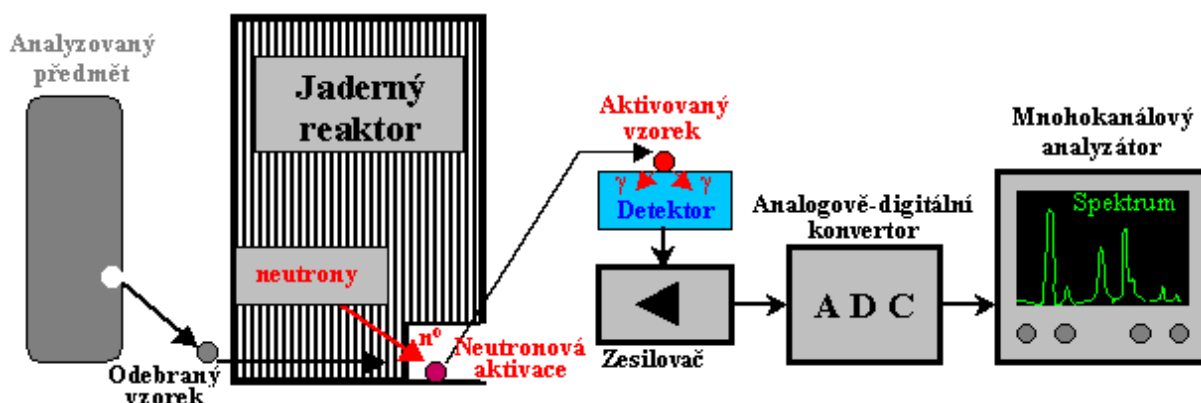
V iontovém zdroji hmotnostního spektrometru při vysokém vakuu dostávají molekuly pozitivní náboj. Pak procházejí elektrickým polem, kde se jednotlivé fragmenty i molekulový kation urychlují podle velikosti náboje a kolmo působícím magnetickým polem, v němž se vychylují podle své hmotnosti a dopadají na detektor (počítač částic). Tak vzniká hmotnostní spektrum. Jako hmotnostní analyzátor za iontovým zdrojem je používán kvadrupólový analyzátor nebo kvadrupólová iontová past. Hmotnostní spektrometry se používají ve spojení s chromatografy [14].

Fluorimetrie

Při fluorimetrických stanoveních se využívá jevu, kdy v některých látkách po ozáření dostatečně energetickým zdrojem světla vzniká fotoluminiscence. Látky přitom vyzařují světlo, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci fluoreskující sloučeniny. Emitované záření fluoreskujících sloučenin má vždy vyšší vlnovou délku (tj. méně energie) než excitační záření, vyvolávající fotoluminiscenci. Základní konstrukce fluorimetrů sestává ze zdroje zářivé energie, dvou optických separačních prvků a detektoru. Zdrojem záření jsou nejčastěji halogenové žárovky a xenonové výbojky. Světlo ze zdroje prochází buď interferenčním filtrem, nebo mřížkovým monochromátorem. Dále prochází květou s roztokem měřeného vzorku a emitovaná fluorescence se měří pod úhlem 90 stupňů, kdy po průchodu filtrem nebo po difrakci reflexní mřížkou dopadá emitované světlo vybrané vlnové délky na fotonásobič [14].

Neutronová aktivační analýza

Neutronová aktivační analýza je vysoce citlivá metoda analýzy chemického složení látek, založená na zachytu neutronů v jádrech zkoumané látky, čímž vznikají radioaktivní jádra [15]. Neradioaktivní látka se ozáří v atomovém reaktoru nebo laboratorním zdroji neutronů neutronovým zářením (množství vzorku stačí nejvýše několik mg a v něm stopy stanovovaného prvku). Tím se některé prvky vzorku stanou radioaktivními. Radioaktivita určeného prvku bude tím vyšší, čím je ho ve vzorku více. Ideální případ nastává, když ve vzorku vznikne pouze jeden druh radionuklidu, což nebývá obvykle možné. Vznikající radionuklidy se od sebe liší poločasem i způsobem rozpadu. S využitím jejich odlišného chování je lze od sebe rozlišit. Až teprve v případě obdobného chování musíme přistoupit k separaci.



Obrázek 2: Typický postup při neutronové aktivační analýze [15]

Obsah stanovovaného prvku se zjišťuje s pomocí etalonu komparační metodou. Etalon obsahuje známé množství prvku, který chceme stanovit. S etalonem se vzorek ozařuje za stejných podmínek a za stejných podmínek a ve stejném čase se měří jejich aktivita [13]. Neutronová aktivační analýza má mimořádně vysokou citlivost, takže je vhodná ke zjišťování stopových množství látek [15]. Při stanovení nezáleží na tom, v jaké chemické podobě se nachází stanovovaný prvek. Celé stanovení může probíhat v moderních zařízeních automaticky [13].

Elektrochemické metody:

Voltametrie a polarografie

Mezi dvojicí elektrod ponořenou v roztoku elektrolytu je vkládáno měnící se napětí a sledujeme procházející proud. Jedna z elektrod je polarizovaná a slouží jako pracovní (měrná), druhá je nepolarizovaná a slouží jako srovnávací. Ze závislosti proudu na napětí (polarogramu, voltamogramu) usuzujeme na druh a obsah analytu (tzv. elektroaktivní látky). Ve voltametii používáme stacionární polarizované elektrody (pevné elektrody, rtuťová filmová elektroda, stacionární rtuťová kapková elektroda). Metody s odkapávající rtuťovou kapkovou elektrodou mají název polarografie [13].

2.12 Referenční hodnoty laboratorních vyšetření

U laboratorních vyšetření vyplývá nutnost zjistit, zda změřená hodnota je fyziologická, zvýšená, nebo snižená. U referenčních hodnot určujeme referenční interval a jeho meze (horní a dolní).

Referenční (fyziologické) rozmezí jsou to takové hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot získaná měřením referenční populace. Za *většinu* se obvykle považuje 95% výsledků. **Referenční populace** je množina (soubor) jedinců, splňujících určité předpoklady (nejčastěji nepřítomnost nemoci) [16].

Určení referenčního rozmezí:

Protože obvykle nelze vyšetřit celou referenční populaci, provádíme náhodný výběr a získáme tak výběrovou referenční skupinu. U ní měříme výběrové referenční hodnoty, určujeme výběrové referenční rozložení a výběrové referenční meze [16]. Výběrová referenční skupina by měla být dostatečně velká, aby odhad referenčního rozmezí odpovídal skutečným referenčním mezím u celé referenční populace. Pro výpočet referenčního rozmezí lze použít dvě různé metody:

Nepřímá metoda – méně používaná, lze použít tam, kde jsou k dispozici pouze data získaná měřením pacientů (tzv. smíšená populace, která se skládá ze zdravých jedinců a jedinců s patologickými hodnotami testu). Výhodou je získání odhadu z populace, jejíž výsledky podle tohoto odhadu hodnotíme. Zároveň máme k dispozici velké množství dat, které můžeme třídit podle pohlaví, věku apod. Nevýhodou je potřeba velkého množství dat (tisíce až desetitisíce) a nemožnost odhadnout typ rozložení výsledků zdravých osob. Meze oproti přímým metodám mají větší směrodatnou odchylku a jsou položeny výše.

Přímá (induktivní) metoda – častěji používané. Nejdříve musíme získat výběrovou referenční skupinu – nejčastěji soubor zdravých jedinců (dárce krve). Nevýhodou je, že věková skupina dárců neodpovídá věkové struktuře hospitalizovaných pacientů (převážně starší osoby), opakované odběry krve ovlivňují proteosyntézu, a prvodárců, kteří by byli vhodnější, je nedostatek. Je nutné si uvědomit, že výsledky mohou být ovlivněny ještě užíváním léků, nedostatkem zavodnění, stresem apod. Naměřená data zpracováváme tak, že je podrobíme exploratorní analýze, distribuci výsledků popíšeme distribuční funkcí:

$$F(y) = P(x \leq y)$$

Kde $F(y)$ je pravděpodobnost, že daná veličina x bude mít hodnotu rovnou číslu y nebo menší. Kvantil (percentil) náhodné veličiny x na hladině α je hodnota x_α , pod kterou leží $100(1-\alpha)$ procent hodnot náhodné veličiny x . V tomto případě dolní referenční mez je 2,5% kvantil a horní referenční mez je 97,5% kvantil. Odhad kvantilů lze provést dvěma způsoby:

1. Parametrická metoda – Používáme ji u normálního rozdělení dat (Gaussovo rozdělení).

U většiny metod je rozložení jiné, pak je nutné data transformovat. Vlastní výpočet je výpočtem aritmetického průměru a směrodatné odchylky s . Odhady referenčních mezí vypočítáme podle vztahu:

$$x \pm a \cdot s$$

kde a je koeficient lišící se podle požadovaných kvantilů. Pro 2,5% a 97,5% kvantil je $a = 1,96$ (přibližně 2). Referenční interval je tedy: $x \pm 2s$. Nesmíme zapomenout ověřit si spolehlivost získaných referenčních odhadů. Pro výpočet stačí menší počet dat (minimálně 40).

2. Neparametrická metoda – lze ji použít bez ohledu na typ rozložení výsledků. Je nutné vyšetřit poměrně velkou výběrovou skupinu. Výsledky seřadíme vzestupně, na obou koncích oddělíme určité procento výsledků (většinou 2,5% nahoře a 2,5% dole v případě, že chceme, aby uvnitř referenčního rozmezí zůstalo 95% výsledků). Pak vypočítáme dolní mez referenčního intervalu $k_d = 0,025(n+1)$, horní mez $k_h = 0,975(n+1)$, tedy jako k -tou hodnotu ze seřazeného výběru, nedostaneme-li celé číslo, provedeme lineární interpolaci mezi sousedními hodnotami [14].

Referenční hodnoty pro stroncium u dospělé populace:

Sérum: < 50 $\mu\text{g/l}$

Dialyzovaní pacienti až přes 300 $\mu\text{g/l}$.

Pacienti užívající preparáty se stronciem přes 1 mg/l [14]

3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zavést metodu pro stanovení stroncia pomocí bezplamenové AAS v biologických materiálech (sérum, plazma, plná krev, moč).

Zjistit koncentraci stroncia v plazmě či séru (popř. moči) u některých souborů pacientů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakterizace, odběr a zpracování biologického materiálu

Pro analýzu stroncia v biologickém materiálu bylo použito:

- a) 23 vzorků plazmy pacientů (průměrný věk 70 let) léčených stronciumranelátem (Protelos 2g/den)
- b) 17 vzorků sbírané moči (24 hodin) pacientů (průměrný věk 70 let) léčených stronciumranelátem (Protelos 2g/den),
- c) 95 vzorků plazmy dětí ve věku < 1 rok
- d) 80 vzorků pupečnickové krve (40 vzorků arteriální krev a 40 vzorků venózní krev) a
- e) 12 vzorků krysích jater.

Vzorky séra dětí byly získány ze zbytku materiálu dodaných pro rutinní vyšetření do laboratoří ÚKBP. Vzorky byly rozděleny do dvou skupin podle věku: 1.skupina (1-28 den, n = 29), 2.skupina (1-14 měsíc, n = 66). Získané vzorky nesrážlivé arteriální a venózní krve byly centrifugovány 15 minut při 4 000 otáčkách. Poté byla odebrána plazma do připravených mikrozkuavek.

K přípravě vzorků krysích jater bylo k dispozici 12 vzorků vlhké tkáně. Z každého vzorku bylo odebráno a naváženo cca 500 mg vlhké tkáně, přeneseno do skleněných zkumavek a dáno na led. Poté byla provedena homogenizace. Ke každému vzorku vlhké tkáně bylo přidáno 2 ml homogenizačního pufru (10 mM Tris-HCl pufr, 5 mM 2-mercaptoethanol, pH 8,6). Ve zkumavkách byla tkáň rozstříhána nůžkami na menší kusy a následně dezintegrována homogenizátorem 3 minuty, dáno na led a poté homogenizováno další cca 3 minuty. Poté byl homogenát centrifugován 15 minut při 4 000 otáčkách. Odebraný supernatant byl zahříván 10 minut při 65°C. Poté se dalo opět centrifugovat 15 minut při 4 000 otáčkách a byl odebrán supernatant do připravených mikrozkuavek.

Všechny připravené vzorky byly uskladněny v mrazícím boxu při -20°C pro pozdější analýzu.

4.2 Použité chemikálie a materiál

Standardní roztok Sr 1 g/l (Fluka)

HNO₃ (Fluka)

LaCl₃.H₂O (extra čistý Fluka)

KCl (extra čistý Fluka)

8% Butanol (Riedel-de Haën)

Triton X-100 (Fluka)

Antifoam A (Fluka,)

HCl (Fluka)

Tris-HCl

2-mercaptoethanol

fosforečnanový pufr (pH = 6,8)

Pipety, špičky, plastové zkumavky, stojánky, mikrozukavky, vialky, nůžky, skalpel, pinzeta

Příprava roztoků a reagensů:

Plamenová AAS:

Zásobní kalibrační roztoky Sr:

Do 100 ml odměrných baněk byl odpipetován zásobní roztok Sr (Fluka 1 g/l), přidány 2 ml HNO₃, 8 ml destilované vody a doplněno ředícím roztokem

Ředící roztok s modifikátorem Sr:

20 g LaCl₃.H₂O (extra čistý Fluka)

4 g KCl (extra čistý)

80 ml 8% butanolu

Doplněno do 1 l destilovanou vodou

Bezplamenová AAS:

Kalibrační roztoky Sr:

Pracovní mezistandard (2,5 mg/l)

Do 100 ml odměrné baňky (plastové) bylo odpipetováno 250 μ l standardu Sr, přidány 2 ml HNO_3 a doplněno ředícím roztokem po rysku

Pracovní standard pro sérum a moč

Do 100 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 1 000 μ l mezistandardu, přidáno 2 ml koncentrované HNO_3 a doplněno ředícím roztokem po rysku. Skladováno v plastové nádobě.

Proplachovací roztok:

250 μ l Triton X-100

2 080 μ l Antifoam A

250 μ l HCl

Doplněno do 500 ml destilovanou vodou.

Ředící roztok Sr:

2 ml Tritonu a 2 ml Antifoamu bylo doplněno do 1 l destilovanou vodou.

Homogenizační pufr:

0,605g Tris-HCl

0,0195g 2-mercaptoethanolu

Doplněno do 0,5 l destilovanou vodou.

4.3 Přístroje

Bezplamenový atomový absorpční spektrometr Varian SpectrAA GF 220 Z (obr. 3)

Plamenový atomový absorpční spektrometr Varian SpectrAA 220 FS

Centrifuga Heraeus 1.0R

Třepačka VELP

Homogenizátor DIAX 100 (Heidolph)

Obrázek 3: Varian 220 Z



4.4 Stanovení stroncia atomovou absorpční spektrofotometrií (AAS)

Princip metody:

Při AAS se měří úbytek elektromagnetického záření (absorbance) způsobený absorpcí volnými atomy prvků, které musí být v plynné fázi. Atomy látek ve vzorku se do plynné fáze dostávají procesem zvaným atomizace. Analyticky jsou využívány přechody vycházející ze základních energetických hladin elektronů. Podmínky atomizace jsou proto voleny tak, aby absorbující atomy nebyly excitovány, ale aby byly v základním energetickém stavu. Vztah mezi absorbancí a koncentrací stanovovaného prvku je dán Lambertovým-Beerovým zákonem: $I = I_0 \cdot e^{-(k \cdot n \cdot l)}$

Plamenová atomizace

Pro atomizaci se využívá plamenů hořících směsí paliva a okysličovadla. Palivem je acetylen a oxidantem vzduch. Nevýhodou plamenové atomizace je samotný plamen (poměrně nedokonalé dávkovací zařízení). Jenom malá část aspirovaného vzorku (asi 10%) se dostane do plamene a je atomizováno. Vzorek je ředěn velkým množstvím nosných plynů, které přivádí aerosol k plameni. Volné atomy jsou přítomny ve světelné stopě jen velmi krátkou dobu (rezidenční čas), obvykle 10^{-4} sekund. Rezidenční čas závisí na rychlosti nosných plynů. Proto se využívá při analýzách větších obsahů analytu ve vzorku.

Atomizace v grafitové píčce

Plamen je nahrazen elektricky zahřívanou grafitovou kyvetou v argonové komoře. Tato kyveta je ještě potažena pyrolytickou ochrannou vrstvou, která brání její oxidaci. Kyveta je zahřívána kontrolovaně protékajícím elektrickým proudem v několika teplotních krocích, v nichž postupně dojde k odstranění matrixových komponentů a k atomizaci. Disociace molekul je ovlivněna teplotou atomizace, stupněm zahřívání a redukčním prostředím povrchu grafitové kyvety. Každý z analytů měřený v grafitové kyvetě je atomizován. Atomy zůstávají v oblasti kyvety déle než v plameni. Kyvetou prochází optický paprsek, který je absorbován. Výsledkem jsou naměřené koncentrace na úrovni detekčního limitu ppb (parts per bilion). Typický program pro měření analytu pomocí bezplamenové AAS se skládá ze tří základních kroků:

1. Sušení

Vzorek je nanesen pipetorem do grafitové píčky. Je usušen při teplotě jeho varu nebo mírně pod teplotou varu rozpouštědla (80-200°C). Rozpouštědlo je odpařeno. Na povrchu grafitové kyvety zůstane uchycený tenký film.

2. Spalování nebo spékání

Vyvine se teplota (350-1600°C), která umožní spálení všech složek matrice, v které je analyt stanovován. Během spalování se složky matrice mění na plynné oxidy, které unikají z kyvety. Analyt vytvoří většinou teplotně odolný oxid, který zůstává až do atomizace.

3. Atomizace

Píčka je během atomizace zahřáta na atomizační teplotu. Vyvine se oblak volných atomů v místě průchodu optického paprsku. V tomto momentě je měřena absorbance. Atomizační teplota závisí na těkavosti stanovovaného prvku (1 800-3 000°C)

Zdrojem záření je při stanovení netěkavých kovů dutá katodová výbojka (katoda je z kovu, pro který je lampa určena). V plamenové verzi je vzorek rozprašován tryskou do mlžné komory a proudí společně s palivem (acetylen-vzduch) přes hořák do laminárního plamene. Bezplamenové elektrotermické atomizátory pracují ve třech teplotně odlišných krocích.

K izolaci analyzované spektrální čáry od ostatních čar zdroje záření se používá monochromátor (mřížka) a k detekci fotonásobič.

Příprava vzorků před AAS analýzou

Ředění vzorků:

Vzorky byly ředěny 1:19, tedy 100 µl plazmy, séra, moči nebo kontrol a 1,9 ml ředícího roztoku a důkladně promíchány na třepače. Poté vzorky přelity do speciálních plastových zkumavek (vialek), které byly vkládány do karuselu přístroje.

Vlastní měření:

V nádobě pod karuselem přístroje doplněn proplachovací roztok. Spuštěny všechny součásti přístroje kromě zesilovače lampy. Vkládáno do těchto pozic v karuselu:

Do pozice 26 ředící roztok, pozice 27 standard. Do pozice 1 až 25 ostatní vzorky, pozice 1 a 2 kontroly (s1 a s2), na každou 11 pozici kontroly, po 10 vzorcích probíhá recalibrace. U vzorků vkládán diluční faktor 20.

Podmínky analýzy stroncia

Tabulka 3: Hlavní přístrojové parametry pro analýzu stroncia

Prvek	Vlnová délka (nm)	Šířka štěrbin (nm)	Napětí (Volt)	Proud na lampě (mA)	Korekce pozadí
Sr	460	0,5		7	Ne

Tabulka 4: Parametry plamenové AAS pro stanovení stroncia

Prametr	Sr
Průtok acetylénu (l/min)	13,5
Průtok vzduchu (l/min)	2
Čas analýzy (s)	3
Výška hořáku (mm)	0

Tabulka 5: Teplotní program pro bezplamenovou AAS pro stanovení stroncia

Krok	Teplota (°C) Sr	Čas (s) Sr	Průtok(l/min) Sr	Typ plynu Sr	Čtení Sr	Záznam signálu Sr
1	95	2,0	3,0	Normal	Ne	Ne
2	105	8,0	3,0	Normal	Ne	Ne
3	120	5,0	3,0	Normal	Ne	Ne
4	120	10,0	3,0	Normal	Ne	Ne
5	200	10,0	3,0	Normal	Ne	Ne
6	1100	5,0	3,0	Normal	Ne	Ne
7	1100	10,0	3,0	Normal	Ne	Ne
8	1100	1,0	0,0	Normal	Ne	Ano
9	2750	0,8	0,0	Normal	Ano	Ano
10	2750	0,5	0,0	Normal	Ano	Ano
11	2850	0,1	3,0	Normal	Ne	Ne
12	2850	1,4	3,0	Normal	Ne	Ne

4.5 Zpracování naměřených dat

Výsledky měření byly zpracovány v programu Microsoft Excel. V tomto programu byla provedena také statistická analýza dat. U naměřených dat byla vypočítána průměrná hodnota, směrodatná odchylka, variační koeficient, minimální hodnota a maximální hodnota. Byly porovnány průměrné hodnoty koncentrací stroncia souborů *dvouvýběrovým t-testem s nerovností rozptylů* na hladině významnosti 0,05. U vzorků krysích jater byl proveden přepočítání koncentrace stroncia v $\mu\text{g/l}$ na $\mu\text{g/mg}$ vlhké tkáně.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analytické vlastnosti metody pro stanovení stroncia

Opakovatelnost v sérii a mezi sériemi byla zhodnocena pomocí kontrolního materiálu na 1 hladině koncentrace Sr. Byly stanoveny průměry měření, variační koeficienty a směrodatné odchylky opakovatelnosti (v sérii 20 měření) a opakovatelnosti mezi sériemi (vzorek byl měřen 20 dní po sobě v singletu).

Souhrn výsledků opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi analýzy stroncia je uvedena v **tabulce 6**.

Tabulka 6: Opakovatelnost měření stroncia

	n	Cílová hladina (µg/l)	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	CV (%)	Bias (%)
Opakovatelnost v sérii						
Nízká kontrola	20	105	93,28	5,06	5,4	11,2
Opakovatelnost mezi sériemi						
Nízká kontrola	20	105	86,48	8,52	9,9	17,6

Opakovatelnost v sérii a mezi sériemi byla vzhledem k nízkým hodnotám CV (< 10 %) velmi dobrá.

5.2 Stanovení stroncia u pacientů léčených stronciumranelátem

Bylo analyzováno 23 vzorků plazmy a 16 vzorků moči pacientů léčených stronciumranelátem. Byla vypočítána průměrná hodnota, směrodatná odchylka, minimální hodnota a maximální hodnota. Koncentrace stroncia v plazmě jsou uvedeny v **tabulce 7**.

Tabulka 7

Pacienti léčení stronciem		
č.vzorku	datum odběru	plazma (µg/l)
1	28.12.2007	9421
2	28.12.2007	13255
3	28.12.2007	17139
4	4.1.2008	6707
5	8.1.2008	4900
6	11.1.2008	17757
7	14.1.2008	30
8	18.1.2008	8311
9	18.1.2008	5595
10	18.1.2008	8287
11	22.1.2008	14502
12	22.1.2008	4115
13	22.1.2008	7022
14	29.1.2008	14233
15	29.1.2008	6610
16	29.1.2008	8519
17	31.1.2008	219
18	1.2.2008	8914
19	5.2.2008	3307
20	5.2.2008	227
21	5.2.2008	8769
22	13.2.2008	11205
23	19.2.2008	5589

Koncentrace stroncia v moči (U-Sr) a odpad moči za 24 hodin (dU Sr) jsou uvedeny v **tabulce 8**.

Tabulka 8

Pacienti léčení stronciem				
č.vzorku	datum odběru	U-Sr (µg/l)	dU Sr mg/24 hod	V moče ml/24 hod
1	28.12.2007	25910	65,81	2540
2	28.12.2007	47850	105,27	2200
3	4.1.2008	70011	84,01	1200
4	8.1.2008	7524	15,80	2100
5	11.1.2008	56281	123,82	2200

6	14.1.2008	132	0,17	1250
7	18.1.2008	34543	58,72	1700
8	18.1.2008	25009	78,78	3150
9	18.1.2008	30561	73,35	2400
10	22.1.2008	62689	125,38	2000
11	22.1.2008	14917	37,59	2520
12	29.1.2008	37741	117,00	3100
13	29.1.2008	10802	34,73	3215
14	29.1.2008	15458	231,87	15000
15	31.1.2008	1003	1,60	1600
16	19.2.2008	34222	88,29	2580

Průměrná hodnota (\pm směrodatná odchylka) koncentrace stroncia v plazmě byla 8027 ± 4995

$\mu\text{g/l}$. Minimální hodnota byla $30 \mu\text{g/l}$ a maximální hodnota $17757 \mu\text{g/l}$.

Průměrná hodnota (\pm směrodatná odchylka) koncentrace stroncia v moči byla 29666 ± 21390 $\mu\text{g/l}$. Minimální hodnota byla $132 \mu\text{g/l}$ a maximální hodnota byla $70011 \mu\text{g/l}$.

V souboru pacientů léčených stronciumranelátem byla průměrná koncentrace stroncia v plazmě vysoká. Referenční hodnoty koncentrace stroncia v séru zdravých lidí jsou $< 50 \mu\text{g/l}$, u pacientů užívající preparáty se stronciem jsou přes 1 mg/l , tedy převyšují referenční hodnoty až 355x . Vysoký rozptyl hodnot koncentrací v plazmě pacientů léčených stronciumranelátem svědčí o variabilitě metabolismu Sr u pacientů s osteoporózou. Svědčí pro to i odpad Sr močí, který se pohybuje od $0,17$ do 232 mg/24 hodin . Vzhledem k tomu, že chronická toxicita stroncia stále není dostatečně zdokumentována, bylo by vhodné u pacientů užívajících stronciumranelát monitorovat v průběhu léčby hladiny stroncia.

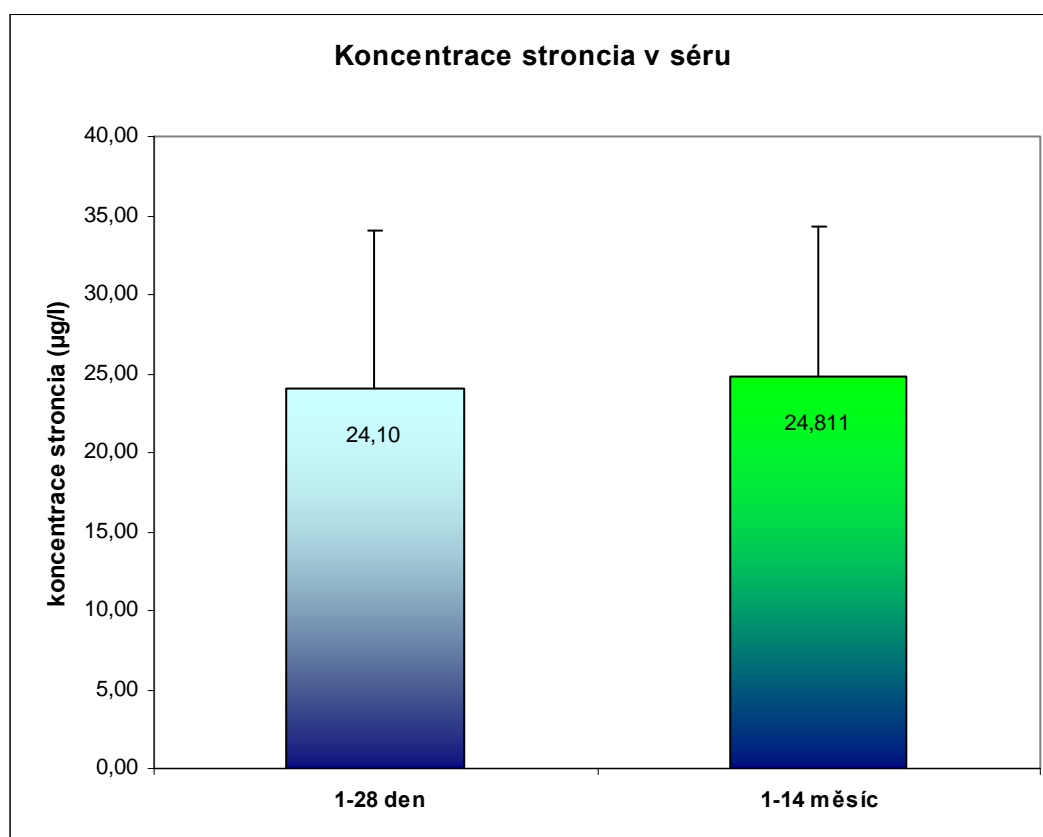
5.3 Stanovení sérové koncentrace stroncia u dětí

95 vzorků pacientů v rozmezí věku od 1 do 14 měsíců bylo rozděleno do dvou skupin podle věku: 1. skupina (1-28 dní) a 2. skupina (1-14 měsíců). Průměrná hodnota koncentrace stroncia v séru v první skupině byla porovnána s průměrnou hodnotou stroncia v séru ve 2. skupině *dvouvýběrovým t testem s nerovností rozptylů* v tabulce 9 s grafickým znázorněním v grafu 1.

Tabulka 9

Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů		
	1.-28. den	1.-14. měsíc
Stř. hodnota	24,097	24,854
Rozptyl	98,387	90,955
Pozorování	29,000	65,000
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0,000	
Rozdíl	52,000	
t stat	-0,346	
P(T<=t) (1)	0,365	
t krit (1)	1,675	
P(T<=t) (2)	0,731	
t krit (2)	2,007	
průměr	24,1	24,81
směrodatná odch.	9,92	9,47
VK (%)	41,16	38,17
min.hod	12,96	11,16
max.hod	45,4	57,36

Graf 1



Průměrná koncentrace (\pm směrodatná odchylka) stroncia v séru v 1. skupině byla 24,10 \pm 9,92 $\mu\text{g/l}$ a v 2. skupině byla 24,81 \pm 9,47 $\mu\text{g/l}$. Variační koeficient v 1. skupině byl 41,16 a ve 2. skupině byl 38,17. Minimální hodnota ve skupině 1. byla 12,96 $\mu\text{g/l}$, ve skupině 2. byla 11,16 $\mu\text{g/l}$. Maximální hodnota ve skupině 1. byla 45,4 $\mu\text{g/l}$ a ve 2. skupině 57,36 $\mu\text{g/l}$. Průměrné koncentrace stroncia mezi novorozenci a kojenci se statisticky nelišily.

Koncentrace stroncia u novorozenců a kojenců jsou nižší než ty, které pozorujeme u dospělé populace (okolo 50 $\mu\text{g/l}$). Je to možné vysvětlit vyšším metabolickým obratem tohoto kovu v průběhu těhotenství a v prvním roce života dítěte, koncentrace je určována i skladbou potravy dítěte, která je odlišná od skladby dospělého jedince. To nás vedlo k vytvoření referenčních mezí pro stroncium u dětí do 1 roku. S přihlédnutím k charakteru souboru jsme pro určení referenčních mezí použili parametrickou metodu. Referenční hodnoty stroncia v séru u dětí jsou následující:

- Děti 1-28 dnů: 4,26 - 43,94 $\mu\text{g/l}$
- Děti 1-14 měsíců: 5,87 - 43,75 $\mu\text{g/l}$

5.4 Stanovení stroncia v pupečnickové krvi

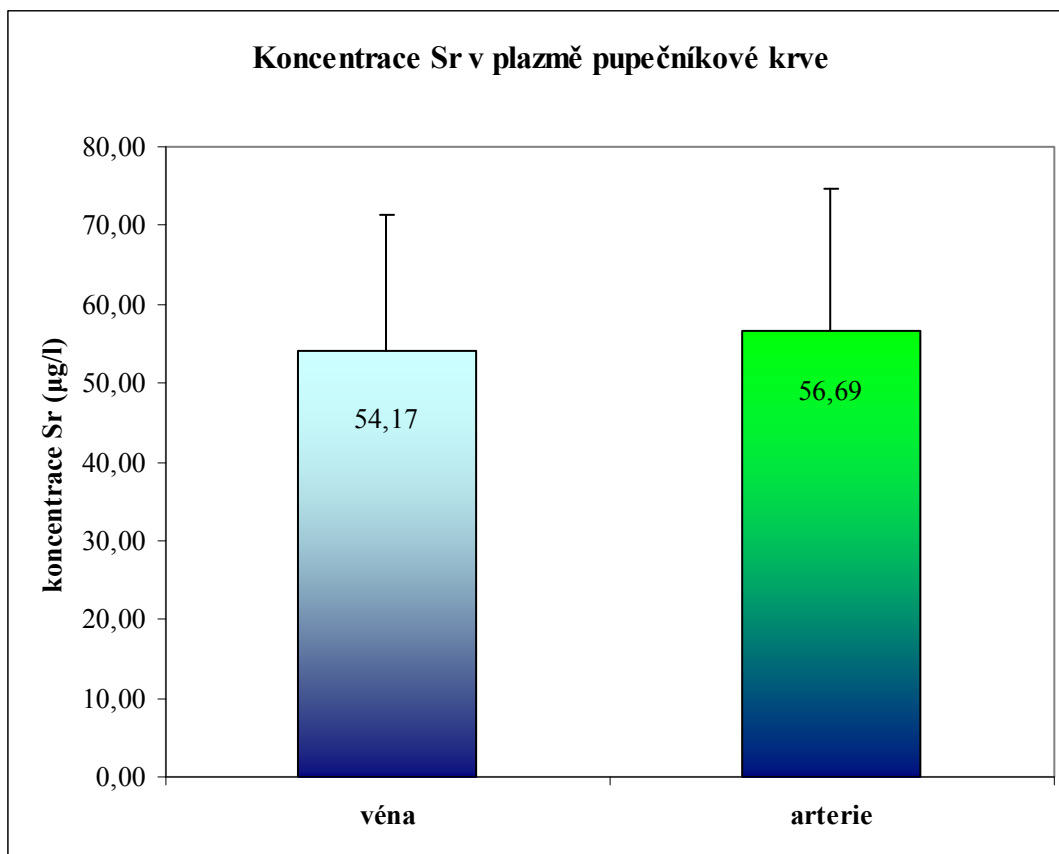
Byla provedena analýza 80 vzorků pupečnickové krve. Porovnání průměrných hodnot bylo provedeno *dvouvýběrovým t-testem* v **tabulce 10** s grafickým znázorněním v **grafu 2**.

Tabulka 10

Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů		
	věna	arterie
Stř. hodnota	54,17	56,69
Rozptyl	295,05	326,14
Pozorování	40,00	40,00
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0,00	
Rozdíl	78,00	
t stat	-0,64	
P(T<=t) (1)	0,26	
t krit (1)	1,66	
P(T<=t) (2)	0,52	
t krit (2)	1,99	
sm. odchylka	17,18	18,06
průměr	54,17	56,69
minim. hodnota	13,43	19,41

max. hodnota	107,45	115,05
--------------	--------	--------

Graf 2



Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi koncentracemi stroncia ve venózní a arteriální krvi na hladině významnosti 0,05.

Průměrná hodnota (\pm směrodatná odchylka) koncentrace stroncia ve venózní krvi byla $54,17 \pm 17,18 \mu\text{g/l}$ a v arteriální krvi $56,69 \pm 18,06 \mu\text{g/l}$. Minimální hodnota koncentrace stroncia ve venózní krvi byla $13,43 \mu\text{g/l}$ a v arteriální krvi $19,41 \mu\text{g/l}$. Maximální hodnota ve venózní krvi byla $107,45 \mu\text{g/l}$ a v arteriální krvi $115,05 \mu\text{g/l}$.

V souboru novorozenců byly porovnány koncentrace stroncia ve venózní a arteriální pupečnickové krvi. Koncentrace stroncia byla vyšší v arteriální krvi (arteriální krev odvádí zpět krev cirkulující v plodu k placentě). Více pozornosti se věnuje stopovým prvkům jako je např. mangan a selen (účastní se procesů chránících buňku před volnými radikály), jejichž snížený

přísun přes fetoplacentární bariéru je zřejmě spojen s poruchami vývoje plodu. V souvislosti se stronciem tento pohyb nebyl zatím prokázán.

5.5 Stanovení stroncia v jaterní tkáni

Byla stanovena koncentrace stroncia ve dvanácti vzorcích potkaních jater. Koncentrace stroncia v $\mu\text{g/l}$ byla přepočtena na koncentraci stroncia v $\mu\text{g/mg}$ vlhké tkáně. Hodnoty koncentrací jsou uvedeny v **tabulce 11**.

Tabulka 11

Koncentrace ($\mu\text{g/l}$)	Sr Koncentrace ($\mu\text{g/mg}$)
6,71	$2,64 \cdot 10^{-5}$
5,13	$2,44 \cdot 10^{-5}$
5,49	$1,95 \cdot 10^{-5}$
5,62	$1,46 \cdot 10^{-5}$
4,33	$1,86 \cdot 10^{-5}$
6,16	$1,76 \cdot 10^{-5}$
7,81	$1,86 \cdot 10^{-5}$
4,88	$1,08 \cdot 10^{-5}$
3,28	$2,08 \cdot 10^{-5}$
4,50	$1,54 \cdot 10^{-5}$
6,53	$3,32 \cdot 10^{-5}$
7,87	$3,71 \cdot 10^{-5}$
Průměr:	
5,69	$2,14 \cdot 10^{-5}$

Nemohli jsme porovnat námi naměřené hodnoty s jinými údaji v literatuře. Pro koncentraci v kostní tkáni se ale uvádí několikrát vyšší koncentrace než v krvi a měkkých tkáních.

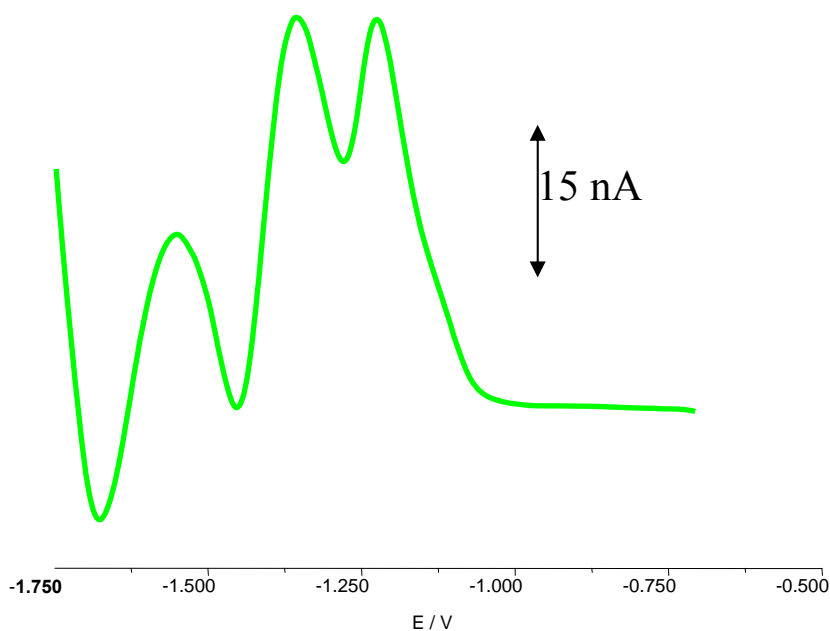
5.6 Stanovení metalothioneinu v jaterní tkáni

Koncentrace metalothioneinů byla stanovena v 11 vzorcích potkaních jater. Hodnoty koncentrací MT jsou uvedeny v **tabulce 12**. Typický voltamogram z analýzy je uveden na **grafu 3**.

Tabulka 12

Koncentrace MT (μM)	Konc. MT ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
kry1	1,54	$4,44 \cdot 10^{-5}$
kry2	1,59	$4,54 \cdot 10^{-5}$
kry3	1,52	$4,34 \cdot 10^{-5}$
kry4	1,52	$4,34 \cdot 10^{-5}$
kry5	1,45	$4,14 \cdot 10^{-5}$
kry6	1,47	$4,20 \cdot 10^{-5}$
kry7	1,47	$4,20 \cdot 10^{-5}$
kry8	1,43	$4,08 \cdot 10^{-5}$
kry9	1,37	$3,92 \cdot 10^{-5}$
kry10	1,30	$3,72 \cdot 10^{-5}$
kry11	1,40	$4,00 \cdot 10^{-5}$
průměr	1,46	$4,17 \cdot 10^{-5}$

Graf 3: Typický voltamogram z analýzy metalothioneinu v potkaních játrech



6. ZÁVĚR

Bylo provedeno stanovení koncentrace stroncia u souborů pacientů s osteoporózou léčených stronciumranelátem, dětských pacientů. K tomuto účelu byla zavedena metoda plamenové a bezplamenové AAS, která z hlediska některých analytických znaků metody vykazovala výborné vlastnosti a je ji možno používat v běžné klinicko-biochemické diagnostice.

V souboru pacientů léčených stronciumranelátem byla zjištěna poměrně vysoká variabilita koncentrace stroncia v plazmě i v odpadu Sr močí. Ze souboru dětí z nemocniční populace jsme určili referenční meze pro stroncium v séru. Byla stanovena koncentrace stroncia v plazmě pupečnickové krve, nebyl nalezen rozdíl mezi koncentrací ve venózní a arteriální krvi. Průměrná koncentrace stroncia v jaterní tkáni potkanů byla $2,14 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Vzhledem k málo zdokumentované chronické toxicitě stroncia by mělo monitorování jeho plazmatických koncentrací být zavedeno u pacientů léčených stronciumranelátem. Koncentrace stroncia v krvi novorozenců a kojenců je ovlivněna potravou a jinými enviromentálními faktory.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Nielsen P., S.** The biological role of strontium, *Bone*, 35, p. 583-588, 2004
2. **Cohen-Solal M.** Strontium overload and renal osteodystrophy, *Nephrol Dial Transplant*, 17, p. 30-34, 2002
3. **Kirrane B., Nelson L., Hoffman, R.** Massive Strontium Ferrite Ingestion without Acute Toxicity, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 99, p. 358-359, 2006, ISSN 1742-7835
4. **D'Haese P., Couttenye M., Lamberts V., Elseviers M., Goodman G., Schrooten I., Cabrera E., Broe E.** Trace Metals in Renal Osteodystrophy, *Clinical Chemistry*, 9, p. 1548-1556, 1999
5. **Morohashi T., Sano T., Yamada S.** Effect of strontium on calcium metabolism in rat: I. A distinction between pharmacologic and toxic doses, *Jpn J Pharmacol*, 64, p. 155-162, 1994
6. **Morohashi T., Sano T., Harai K.** Effect of strontium on calcium metabolism in rats: II. Strontium prevents the increased rate of bone turnover in ovariectomised rats, *Jpn J Pharmacol*, p. 153-9, 1995
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Strontium_ranelate
8. <http://www.bnzlin.cz/oddeleni/ikipvz/dokument/index.php?app=vdisk&sort=3>
9. **Adam V., Blašík O., Křížková S., Lubal P., Kukačka J., Průša R., Kizek R.** Laboratorní přístroje a postupy: Využití Brdičkovy reakce pro stanovení metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory, *Chem. Listy*, 102, p. 51-58, 2008
10. **Vasak M.** Advances in metallothionein structure and functions, *J Trace Elem Med Biol*, 19, p. 13-17, 2005
11. **Thirumoorthy N., Kumar M., Sundar S., Panayappan L., Chatterjee M.** Metallothionein: An overview, *World J Gastroenterol*, 13, p. 993-996, 2007
12. **Abdel-Mageed A., Agrawal K.** Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response, *Cancer Res*, 58, p. 2335-2338, 1998
13. **Klouda P.** Moderní analytické metody, Pavel Klouda, s. 132, 2003 ISBN 80-86369-07-2
14. **Zima T.** Laboratorní diagnostika, Galén, Karolinum, 2. vydání, s. 906, 2007, ISBN 978-80-7262-372-3

15. [http>//astronuklfzyika.cz/JadRadMetody.htm#KontrastLatky](http://astronuklfzyika.cz/JadRadMetody.htm#KontrastLatky)
16. **Racek J.** et al. Klinická biochemie, Galén, s. 329, 2006, ISBN 80-7262-324-9

8. SEZNAM ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrofotometrie
AMP	adenosinmonofosfát
MT	metalothionein
PTH	parathyrin
SD	směrodatná odchylka
CV	variační koeficient

