

Simultane AAS-Bestimmungen von Selen und Zink im Blut und seinen zellulären Bestandteilen, demonstriert am Beispiel der oligo-anurischen Niereninsuffizienz

Simultaneous AAS determinations of selenium and zinc in whole blood and its cellular components as demonstrated in oligo-anuric renal failure

J. D. Kruse-Jarres*, M. Rückgauer*, Y. Schmitt**, P. Bäck*, A. Bäuerle-Bubeck*, I. Moser*, G. Streit*, A. Zeyfang*

Zusammenfassung

Die üblicherweise angewandte Bestimmung einzelner Spurenelemente in Plasma oder Vollblut zur Beurteilung einer ausreichenden Versorgung mit Spurenelementen ist unbefriedigend. Zur zuverlässigen Bestimmung von Spurenelementen in korpuskulären Bestandteilen des Blutes wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, auch vorgeschädigte Zellen zur Analyse mit heranziehen zu können. Somit können Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Lympho-/Monozyten nahezu fremdzellfrei isoliert werden.

Als Anwendungsbeispiel eignet sich das oligo-anurische Nierenversagen. Für die relevante Beurteilung von Spurenelementen ist die Bestimmung in 2 verschiedenen Zelltypen wichtig: die Granulozyten zeigen den Versorgungsstatus des Selen an, die mononukleären Lympho-/Monozyten die Retention von Selen mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion. Beim Zink eignen sich im akuten oligo-anurischem Nierenversagen vor allem die kernlosen Erythrozyten oder Thrombozyten zur Beurteilung von Umverteilungsvorgängen zwischen den Kompartimenten im Körper; wohingegen die Granulozyten ein echtes Defizit anzeigen.

Anschriften der Autoren:

* Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Katharinenhospital Stuttgart

** Institut für Laboratoriumsmedizin, Städtische Kliniken Darmstadt

Korrespondenz-Adresse:

Prof. Dr. med. Jürgen D. Kruse-Jarres,
Katharinenhospital Stuttgart, Institut für Klinische
Chemie und Laboratoriumsmedizin,
Kriegsbergstraße 60, D-70176 Stuttgart

Schlüsselwörter

Selen – Zink – Blutzellen – Niereninsuffizienz – Atomabsorptions-Spektralphotometrie (AAS)

Summary

Many methods used to determine whether there is a sufficient supply of trace elements in whole blood are unsatisfactory. In order to determine trace elements in corpuscular blood particles in a reliable manner, a method has been developed with which even damaged cells can be analysed. Erythrocytes, platelets, and polymorphonuclear and mononuclear leucocytes can be isolated without adding contaminants and in such a way that they are almost free from other cell types.

Oligo-anuric renal failure lends itself to demonstrating the application. Two different cell types are important for assessing trace elements in the human body: polymorphonuclear cells, which indicate the selenium supply status, and mononuclear cells, which indicate the retention of selenium with progressing kidney malfunction. With regard to zinc, the anuclear erythrocytes or platelets are best suited for assessing redistribution processes between various compartments of the body, while polynuclear leucocytes reflect a real deficiency.

Key words

Selen – zinc – blood cells – kidney insufficiency – atomic absorption spectroscopy (AAS)

Einleitung

In letzter Zeit wurden zunehmend viele Daten und Ansichten über den Stoffwechsel der Spurenelemente und ihre Auswirkung auf verschiedene Funktionen des menschlichen Organismus publiziert. Dennoch kann dies nicht darüber hinwegtäuschen, daß viele Funktionen und Aufgaben von Spurenelementen bis heute noch unklar sind.

Mit Blick auf die essentiellen Spurenelemente stehen naturgemäß Veröffentlichungen im Vordergrund, die sich mit einem Mangel eines oder mehrerer Elemente auseinandersetzen. Die Wirkung der Spurenelemente und deren Homöostase im menschlichen Organismus läßt sich jedoch nur dann relevant beurteilen, wenn der gesamte, also auch der obere und somit Toxizität-nahe Bereich der spezifischen Wirkdosis nicht außerachtgelassen wird.

Spurenelement-Defizite treten in der Regel im Zusammenhang mit chronischen Krankheitsprozessen auf. Da diese wiederum durch mannigfaltige Faktoren beeinflußt werden, wie primär oder sekundär auslösende Noxen, Nahrungsaufnahme, Lebensgewohnheiten, circadiane und saisonale Rhythmik, medikamentöse, chirurgische oder physikalische Therapie. Zweiterkrankungen und vieles mehr, muß zunächst die Frage gestellt werden, ob es überhaupt relevant ist, nach Zusammenhängen zwischen veränderten Spurenelement-Konzentrationen im Zusammenhang mit krankheitsassoziierten Symptomen oder Komplikationen zu suchen. Hier fehlt es vielen Publikationen an den erforderlichen Vorbehalten gegenüber allzu schnellen Rückschlüssen.

Kritik muß auch an vielen veröffentlichten Untersuchungen hinsichtlich einer mangelnden Standardisierung und somit unzureichenden Vergleichbarkeit geäußert werden. So werden nicht selten Vergleiche an unterschiedlichen Materialien, an Kollektiven mit verschiedenen Krankheitsprozessen, an Resultaten unterschiedlicher Analysetechniken und an Befunden unter völlig verschiedenen endogenen bzw. exogenen Bedingungen angestellt. Probleme der Kontamination, der Impräzision, der Richtigkeit und der Validität sind nicht immer nachvollziehbar, sodaß es vielfach zu großen Abweichungen der Ergebnisse kommt.

Eines der unbefriedigsten Kriterien für die Aussagekraft von Bestimmungen der Spurenelemente ist die Wahl der Probe als Indikator für die Unterscheidung zwischen physiologischen und pathologischen Vorgängen. Es ist üblich, Serum oder Plasma als geeignete Körperprobe mit gleichemmaßen zuverlässiger Aussage wie in der Routine eines klinisch-chemischen Laboratoriums zu verwenden. Doch leider läßt sich dies nicht bestätigen, wie zahlreiche Publikationen gezeigt haben. Dafür sind drei Faktoren verantwortlich:

1. Das Fehlen von Organspezifität und von Organspeichern
2. Die unterschiedlich feste Bindung an Transport- und andere Proteine (Speziation)
3. Die aktuelle Inanspruchnahme von essentiellen Spurenelementen durch Stoffwechselprozesse in verschiedenen Organen und der daraus resultierende, oft nur kurzfristige und reversible Abstrom aus dem Blut.

Üblicherweise ist Blut deswegen ein geeignetes Untersuchungsmaterial, weil es als Transportmedium zwischen allen Kompartimenten des Organismus' Signalcharakter für biochemische Veränderungen in einzelnen und mehreren Organen haben kann und normalerweise eine Homöostase widerspiegelt. Dieser Gesetzmäßigkeit unterliegen Spurenelemente im menschlichen Organismus nicht, da sie weder eine strenge Organspezifität noch spezifische Speichereigenschaften besitzen. Folgerichtig stellt das Blut als Vermittler zwischen den Organen zwar das Transportmedium, nicht jedoch den Ausgleichs- oder Balance-Indikator für den laufenden Austausch an Spurenelementen zwischen den verschiedenen Kompartimenten dar.

Konsequenterweise muß die Frage nach der Relevanz von Konzentrationsbestimmungen der Spurenelemente im Vollblut, Plasma oder Serum zur relevanten Beurteilung einer Gesamtsituation im menschlichen Organismus skeptisch beantwortet werden. Mit Radioisotopen konnten z.B. für das Zink in Blut, Urin, Stuhl, Leber, Muskulatur und im Gesamtkörper sehr unterschiedlich schnelle und organotypische Umsätze gezeigt werden, die sich innerhalb weniger Stunden signifikant zu ändern vermögen [1]. Ursache dafür sind verschieden intensive, metabolische Aktivitäten, die für ihre biochemischen Funktionen Spurenelemente als Katalysatoren oder Metalloproteine benötigen.

Die beste Aussage würde wohl durch Messungen in typischen Geweben wie z.B. der Muskulatur unmittelbar am Ort des Geschehens erreicht; doch unabhängig von der zumeist ethisch nicht zu vertretenden Biopsie stehen auch diese Informationen in einer dynamischen Abhängigkeit von der Zeit, da das Konzentrationsgleichgewicht durch seine komplexen Beeinflussungen sehr unterschiedlichen Kräften ausgesetzt ist. So kommt es infolge von Gewebsschädigungen z.B. durch größere Wunden, Verbrennungen oder operative Eingriffe zu einer sehr schnellen, aber auch relativ kurzfristigen Störung der Zink-Werte im Blut. Wohingegen ein echter Zink-Mangel der Gewebe infolge einer verminderten nutritiven Zufuhr noch über längere Zeit keine Veränderungen im Blut erkennen läßt, da Muskulatur-, Knochen- und Parenchymgewebe reichliche „Reserven“ haben, wenn sie auch keine eigentlichen Speicherorgane sind.

In der vorliegenden Arbeit gehen wir der Frage nach, inwieweit simultane Bestimmungen der Spurenelemente im Gesamtblut (Vollblut und Plasma) und gleichzeitig in seinen verschiedenen Zellen (Erythrozyten, Granulozyten, Lympho-/Monozyten, Thrombozyten) relevante Auskünfte zu geben vermögen. Die peripheren Blutzellen entstammen vorwiegend dem Knochenmark, das zu den stoffwechselaktivsten Organen im menschlichen Organismus zählt und daher den größten Bedarf an Katalysatoren und somit auch an Spurenelementen hat.

Der Einsatz peripherer Blutzellen in Verbindung mit der Bestimmung in Vollblut und Plasma sowie die Verlaufskontrolle von Konzentrationen der Spurenelemente stellt im theoretischen Ansatz eine erfolversprechende Möglichkeit dar, Änderungen im Haushalt von Spurenelementen zu erfassen. Der Beantwortung der Frage soll an Hand von Selen und Zink nachgegangen werden, da diese derzeit die klinisch bedeutsamsten Spurenelemente sind.

Material und Methode

Probenvorbereitung

Die venösen Blutproben wurden mit Stahlkanülen in Lithiumheparin-haltige Monovetten (150 IU) abgenommen. Innerhalb von zwei Stunden wurden die Zellen aus dem Vollblut durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Zur Vermeidung von Temperatursprüngen wurden die Trennmedien vor Beginn der Aufarbeitung auf Zimmertemperatur gebracht und bei der Zentrifugation eine Temperatur von 20 °C eingehalten. Der Betrag der Zellen in einer Fraktion bzw. die Zellfreiheit des Plasmas wurde sofort nach der Isolation ermittelt (Sysmex K 1000, TOA Medical Electronics). Die Proben wurden bis zur Analyse der Spurenelemente bei -20 °C gelagert.

Abtrennung von Vollblut und Plasma

Vor der Zellfraktionierung wurde ein Aliquot der Proben als Vollblutprobe abgetrennt. Zellfreies Plasma wurde durch Zentrifugieren von Vollblut (3500 g für 10 Minuten) gewonnen. Der Bodensatz mit den gesamten Blutzellen wurde mit Waschlösung (pH 7,4, 142 mmol/l NaCl, 0,33 mmol/l Na_2HPO_4 , 0,5 mmol/l Glucose) vorsichtig auf ca. 1,5 ml aufgeschlämmt und weiterverwendet.

Abtrennung der Thrombozyten

Zur Isolierung der Thrombozyten wurden 4 ml des Trennmediums NycoprepTM (Dichte 1,063 g/ml, Nycomed Pharma) in ein Reagenzglas vorgelegt und

vorsichtig tropfenweise mit der Suspension der Gesamtzellen überschichtet und verschlossen zentrifugiert (250 g für 15 Minuten). Die Thrombozyten – in einer Schicht in der oberen Phase – wurden durch langsames Abpipettieren separiert und der Bodensatz aus Erythrozyten, wenigen restlichen Thrombozyten und den auf dem Sediment schwimmenden Leukozyten wurde mit Waschlösung resuspendiert.

Abtrennung der Granulozyten und mononukleären Zellen

Zur Isolierung der Granulozyten und der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) wurde das bei der Thrombozyten-Isolierung erhaltene Sediment nach vorsichtigem Überschichten auf 4 ml des Trennmediums PolymorphprepTM (Dichte 1,113 g/ml, Nycomed Pharma) zentrifugiert (500 g für 30 Minuten). Aus dem Überstand wurden die deutlich abgegrenzte obere hellere Schicht mit den mononukleären Zellen und die darunter liegende rötlich schimmernde Schicht mit den Granulozyten jeweils getrennt abpipettiert und mit Waschlösung auf jeweils 6 ml aufgefüllt. Der restliche Überstand über der Phase der Erythrozyten wurde zusammen mit der oberen Erythrozyten-Schicht verworfen und der Bodensatz aus Erythrozyten für die Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Granulozyten-Suspension wurde mehrfach mit Waschlösung gewaschen (zentrifugiert bei 280 g für 10 Minuten, der Überstand verworfen und der Bodensatz aus Granulozyten vorsichtig mit Waschlösung auf 6 ml resuspendiert) und schließlich mit Puffer auf 1,5 ml aufgeschlämmt.

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurden die Monozyten-Suspension und ein Aliquot der Gesamtzell-Suspension aus der Plasmagewinnung über 4 ml NycoprepTM vorsichtig geschichtet und zentrifugiert (350 g für 15 Minuten). Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen und der Bodensatz über 3 ml LymphoprepTM (Dichte 1,077 g/ml, Nycomed Pharma) erneut zentrifugiert (1000 g für 20 Minuten). Die mononukleären Zellen – in einer klar von den Erythrozyten abgesetzten Zone – wurden abpipettiert und die gewonnene Zellfraktion durch Lyse der darin enthaltenen Erythrozyten aufgereinigt. Dazu wurde die Suspension zunächst genau 40 Sekunden mit 3 ml bidestilliertem Wasser und anschließend mit 3 ml 1,8 % NaCl-Lösung versetzt und zentrifugiert (250 g für 10 Minuten) und der Bodensatz nach Verwerfen des Überstandes mit Waschlösung auf 3 ml aufgefüllt.

Abtrennung der Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden aus dem Bodensatz nach der Abtrennung der Leukozyten mittels Polymorph-

prepTM isoliert durch Zentrifugation dieser Suspension über 3 ml NycoprepTM (350 g für 10 Minuten) und der anschließenden weiteren Zentrifugation des hierbei entstandenen Bodensatzes über 3 ml PolymorphprepTM (500 g für 10 Minuten). Die Erythrozyten im Sediment wurden mehrfach mit Waschpuffer gewaschen und in 1,5 ml des Puffers aufbewahrt.

Homogenisierung der Proben

Die Probenaufbereitung vor der Analyse erfolgte für alle Zellfraktionen durch einen Verdauungsprozeß zur Homogenisierung der Proben nach dem Auftauen und zur Lösung der Proteinbindung der Spurenelemente. Die Zellsuspensionen wurden dazu mit 30 µl einer 0,5 %igen Proteinase K Lösung (Boehringer Mannheim) und 15 µl einer 20 %igen Lösung von Detergens SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) versetzt – die Vollblutproben mit jeweils dem doppelten Volumen – und 36 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Bestimmung von Selen

Die Bestimmung von Selen erfolgte nach vorhergegangenem Aufschluß und Mineralisierung aller Proben mittels Fließinjektions-Atomspektrometrie (FIAS 200; Perkin-Elmer). Der zweistufige Aufschluß wurde mit dem Mikrowellenaufschlußsystem MLS-1200 (Büchi) durchgeführt. Zur Oxidation (erster Schritt) wurden 194 µl Probe mit 0,5 ml konzentrierter Salpetersäure und 0,25 ml Wasserstoffperoxid (30 %) versetzt und zur Reduktion (zweiter Schritt), nach der das Element als 4-wertiges Selen vorliegt, wurde 1 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben. Das Energieprogramm der Mikrowelle war für beide Reaktionsstufen identisch (zwei Minuten bei 25 % der Gesamtenergie – 1200 Watt – und zwei mal fünf Minuten bei 50 %). Bis zur Analyse wurden die aufgeschlossenen Proben bei –20 °C gelagert. Der Selen-Gehalt der Fraktionen wurde aus dem aufgeschlossenen Material nach Verdünnung mit 0,2 % Entschäumer in 1,5 %iger Salzsäure (1:3,5) am FIAS bestimmt (Gesamtverdünnung der Proben 1:35). Zur Kalibration wurden wäßrige Standardlösungen (Merck) im Bereich von 0,44 bis 1,33 µmol Selen/l eingesetzt, als Laufmittel wurde eine 3 %ige Salzsäure und als Hydriermittel eine 20 %ige alkali-

sche Natriumborhydridlösung verwendet (alle Reagenzien Merck; suprapur). Aus den Proben – mit Hilfe eines Fließinjektions-Ventils kontinuierlich in einen Flüssigkeitsstrom und in eine Reaktionskammer eingebracht – wurde nach Reaktion mit Borhydrid das Selen-Hydrid ausgetrieben, im Argon-Trägergasstrom in eine Quarzküvette transportiert und im Strahlengang einer Hohlkathodenlampe durch Lichtabsorption gemessen.

Bestimmung von Zink

Die Analysen für das Element Zink wurden mittels Graphitrohrofen-Atomabsorptions-Spektrometrie (Zeeman 3030 mit Graphitofen HGA 600 und Probendosierautomat AS 60, Perkin-Elmer) unter Verwendung von Pyroröhrchen ohne Plattform durchgeführt. Die Konzentrations-Bestimmungen in den Leukozyten-Suspensionen erfolgten ohne weitere Verdünnung, während die Vollblutproben 1:100, das Heparinplasma 1:20, die Thrombozyten-Suspensionen 1:20 und die Erythrozyten-Suspensionen 1:100 mit 0,02 %iger Triton X-Lösung verdünnt wurden. Die Kalibration wurde mit SeronormTM (Nycomed Pharma) im Bereich von 13,0 bis 26,0 µmol/l durchgeführt. Da den aufbereiteten Proben Zusätze wie Trennmedium, Waschpuffer, Proteinase K und SDS zugegeben wurden, mußte für jede Blutfraktion eine Blindlösung mit den entsprechenden zugesetzten Substanzen hergestellt werden. Diese wurde mit 0,02 %iger Triton X-Lösung wie die jeweilige Fraktion selbst verdünnt von den Analysenwerten subtrahiert (Leerwert) (Tabelle 1).

Die in das Graphitrohr dosierten Proben wurden nach einem elementspezifischen Programm durch stufenweises Erhitzen getrocknet, die unspezifische Matrix verascht und das verbleibende zu untersuchende Element durch thermische Dissoziation atomisiert und seine Absorption im Strahlengang einer Hohlkathodenlampe gemessen.

Validierung der Nachweisverfahren

Die Kontrolle der Spurenelement-Analysen und die Vermeidung von Fehlerquellen erfolgte nach den Richtlinien für die Qualitätskontrolle [2] und den

Tabelle 1. Zusätze der aufbereiteten Proben

Vollblut		1,5 ml 0,02 % Triton X	60 µl Proteinase K	15 µl SDS
Plasma		1,5 ml 0,02 % Triton X	30 µl Proteinase K	15 µl SDS
Thrombozyten	1,0 ml Nycoprep	0,5 ml 0,02 % Triton X	30 µl Proteinase K	15 µl SDS
Erythrozyten	1,5 ml Waschpuffer		30 µl Proteinase K	15 µl SDS
Leukozyten	1,5 ml Waschpuffer		30 µl Proteinase K	15 µl SDS

Prinzipien der guten Laborpraxis (GLP) [3]. Bei der Überprüfung der Kontamination des Abnahme- und Probenaufbereitungs-Systems (Spülung von Monovetten, Kanülen, Polystyrol-Zentrifugengläser, Polypropylenhütchen und Pipettenspitzen mit 0,2 %iger Salpetersäure und Analyse der Lösung) ergab sich kein nachweisbarer Gehalt an Selen und eine Verunreinigung von Zink mit $0,50 \mu\text{mol/l}$ in den Monovetten (Sarstedt). Von verwendeten Reagenzien wurde lediglich im Waschpuffer ein Zink-Gehalt ($0,15 \mu\text{mol/l}$) festgestellt, der als Blindwert von den Analysenwerten subtrahiert wurde.

Für jedes Element wurde eine Präzisionskontrolle mit einem Matrix-haltigen Poolserum durchgeführt. Die Präzision der Messungen von Tag zu Tag (2-fache Standardabweichung vom Mittelwert bei 20 Bestimmungen) lag bei $16,3 \pm 0,98 \mu\text{mol/l}$ bei der Analyse von Zink und bei $1,25 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$ bei der Analyse von Selen.

In regelmäßigen Abständen während eines Meßvorgangs wurde die Richtigkeit der Methode überprüft, bei Zink und Selen mit Hilfe von Kontrollmaterialien auf der Basis von Serum und Vollblut (SeronormTM Trace Elements und PathonormTM, Nycomed Pharma) und bei Zink zusätzlich auf der Basis von Urin (Lyphochek Level 1 und 2, BioRad). Ab Meßwert-Abweichungen von $> 10\%$ vom Sollwert wurde das Analysensystem überprüft. Die Nachweisgrenzen der Meßmethode (3-fache Standardabweichung vom Blindwert bei 20 Proben) – lagen für Messungen von Selen im Plasma bei $0,06 \mu\text{mol/l}$ und von Zink bei $0,051 \mu\text{mol/l}$.

Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Meßergebnisse wurden Mittelwert, Median, Maximum, Minimum, Standardabweichung und Varianz errechnet. Für den Vergleich der linearen Abhängigkeit der Elementkonzentrationen in den Zellfraktionen des Blutes wurde der *Pearson'sche* Korrelationskoeffizient verwendet. Das einseitige Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Für den Vergleich der Meßgrößen zwischen Gesunden und Patienten kam der U-Test nach *Mann-Whitney* und der *Wilcoxon*-Test (Paardifferenz-Test) zur Anwendung. Bei signifikanten Unterschieden wurde außerdem der t-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Das zweiseitige Signifikanzniveau p wurde beim U- und t-Test auf $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Zellisolierung

Die beschriebenen Schritte der Isolierung von Zellfraktionen ermöglichen gegenüber bisherigen Methoden [4, 5] eine gute Trennung und Reinheit der Zellfraktionen, wie am Beispiel der Isolierung von mononukleären Zellen am besten gezeigt werden kann (Abb. 1).

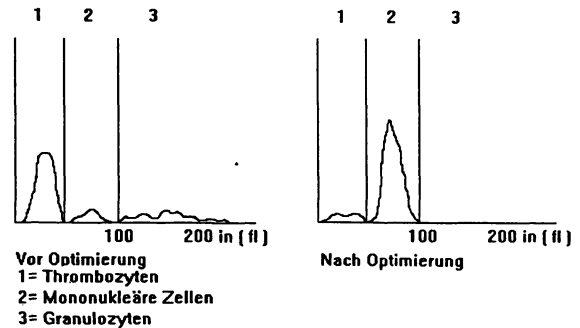


Abb. 1. Ergebnis der Isolierung von mononukleären Zellen

Mit den beiden Trennmethoden konnten die in Tabelle 2 angegebenen Zellzahlen ermittelt werden.

Tabelle 2. Die mit beiden Trennmethoden erhaltenen Zellzahlen (Mittelwert und Standardabweichung)

	Granulo- zyten/nl	Lympho- Monozyten/nl
Alte Methode:		
Gesunde	$1,31 \pm 1,12$	$0,50 \pm 0,9$
Patienten	$5,6 \pm 2,8$	$0,20 \pm 0,1$
Neue Methode:		
Gesunde	$2,45 \pm 1,42$	$1,74 \pm 0,9$
Patienten	$11,6 \pm 10,1$	$1,37 \pm 0,85$

In der Fraktion der mononukleären Zellen konnte der Reinheitsanteil bezüglich der Verunreinigung mit Granulozyten mit der optimierten Methode von 25 % auf 80 % gesteigert werden. Die Verunreinigung mit Thrombozyten nahm in dieser Zellfraktion von durchschnittlich $8,26 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ auf $2,47 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ab.

Referenzwerte

An einem Kollektiv aus 24 weiblichen und 26 männlichen, gesunden Blutspendern im Alter zwischen 20 und 65 Jahren wurden die in Tabelle 3 angegebenen Referenzwerte erstellt.

Tabelle 3. Referenzwerte für Selen und Zink

		Eigene Werte		Literatur		
		MW	s	MW	s	Ref.
Selen						
Vollblut	µmol/l	1,09	0,118	1,296	0,57	[6]
Plasma	µmol/l	0,810	0,122	0,974	0,394	[7]
Thrombozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,0089	0,00019	0,00018		[3]
Erythrozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,00029	0,00002	0,00017		[8]
Granulozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,1259	0,0877			
Lympho-/Monozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,0931	0,0829			
Zink						
Vollblut	µmol/l	75,2	5,16	72,94	3,07	[9]
Plasma	µmol/l	14,85	4,03	13,4	3,65	[10]
Thrombozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,0077	0,0041			
Erythrozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,019	0,001	0,0286		[28]
Granulozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,410	0,1202	0,438	0,293	[11]
Lympho-/Monozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,375	0,3256	0,29	0,09	[9]

Tendenzen und Korrelationen

Mit zunehmendem Alter der Patienten fällt ein Absinken der Plasma-Selen-Konzentration auf ($r = 0,220$, $p = 0,045$). Im Vollblut, in den Erythrozyten und in den Monozyten läßt sich bei steigendem Alter eine Zunahme des Zink-Gehaltes feststellen ($r = 0,241$, $p = 0,032$; $r = 0,306$, $p = 0,009$; $r = 0,314$, $p = 0,007$).

Konzentrationen in verschiedenen Kompartimenten

Bei Selen besteht ein signifikanter Zusammenhang lediglich zwischen den Konzentrationen im Vollblut und in den Erythrozyten ($r = -0,441$, $p = 2 \cdot 10^{-5}$) (Abb. 2). Die Korrelation zwischen den Konzentrationen im Vollblut und im Plasma ist wesentlich geringer ($r = 0,228$, $p = 0,013$).

Auch bei Zink ergibt sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vollblut und den Erythrozyten ($r = 0,689$, $p = 3 \cdot 10^{-10}$) (Abb. 3). Wie schon

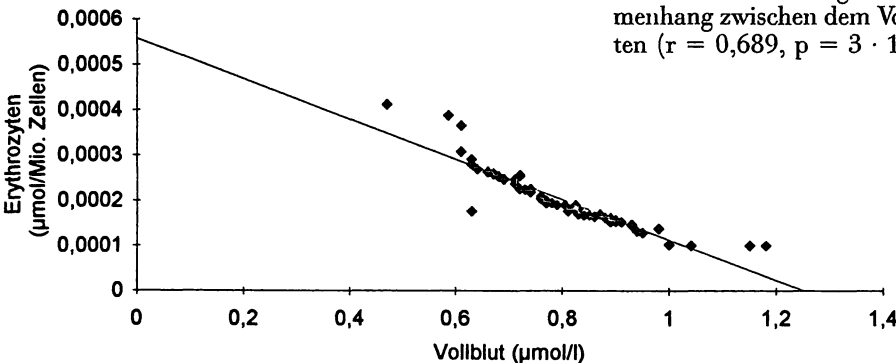


Abb. 2. Korrelation zwischen Selen in Vollblut und Erythrozyten
 $y = -4,45 \cdot 10^{-4} x + 5,57 \cdot 10^{-4}$
 $r = -0,441$
 $p = 2 \cdot 10^{-5}$

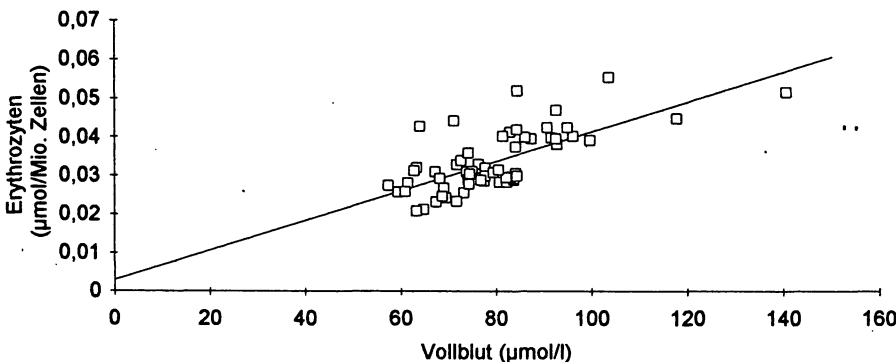


Abb. 3. Korrelation zwischen Zink in Vollblut und Erythrozyten
 $y = 3,85 \cdot 10^{-4} x + 0,00294$
 $r = 0,689$
 $p = 3 \cdot 10^{-10}$

beim Selen, so ist zwischen Vollblut und Plasma eine geringere Korrelation festzustellen ($r = 0,272$, $p = 0,018$). Auffallend ist ein umgekehrt proportionales Absinken der Zink-Konzentration in den Thrombozyten bei einem Anstieg des Zinks im Plasma ($r = -0,328$, $p = 0,005$).

Akutes Nierenversagen

Die Verschiebungen zwischen den Spurenelementen in den verschiedenen Blutbestandteilen lassen sich sehr gut am Beispiel des akuten oligo-anurischen Nierenversagens demonstrieren. Dieses Krankheitsbild ist einerseits geprägt durch eine Einschränkung der Elimination und andererseits durch Stoffwechselveränderungen, die eine Verschiebung von Elementen als Zeichen einer angestrebten Homöostase darstellen.

Bei Patienten mit akutem oligo-anurischem Nierenversagen fallen sowohl im Vollblut als auch in Plasma, Erythrozyten und Granulozyten niedrigere mittlere Selen-Konzentration im Vergleich zu ge-

sunden Probanden auf (Tabelle 4). Diesem Verhalten entgegengesetzt ist eine, allerdings nicht signifikant höhere Selen-Konzentration in den Thrombozyten, jedoch ein hochsignifikant ($p = 3 \cdot 10^{-5}$) höherer Selen-Gehalt in den Lympho-/Monozyten (Abb. 4).

Durch das Überführen der Proben in verschiedene Gefäße kann es zu einer Absorption von Spurenelementen kommen und im Gegenzug zu einer Freisetzung von Ionen aus der Gefäßwand. Aus Glasbehältern kann Zink freigesetzt werden [14]. Auch Gummistopfen tragen zur Kontamination mit Zink bei. Geeignet sind Materialien aus Polypropylen und Teflon.

Einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß können Additiva in den Probengefäßen haben, weswegen diese vor der Analyse auf ihre Reinheit hin untersucht werden müssen, z.B. Heparin. Bei der Herstellung der Bezugs- und Eichlösungen ist auf peinlich genaues Pipettieren zu achten. Um Kontaminationen zu vermeiden, sollen die Materialien erst unmittelbar vor Arbeitsbeginn aus den Originalverpackungen entnommen werden.

Abb. 4. Selen in Granulozyten und Monozyten (KM = männliche Kontrollpersonen, KW = weibliche Kontrollpersonen, P = Patienten mit akutem Nierenversagen)

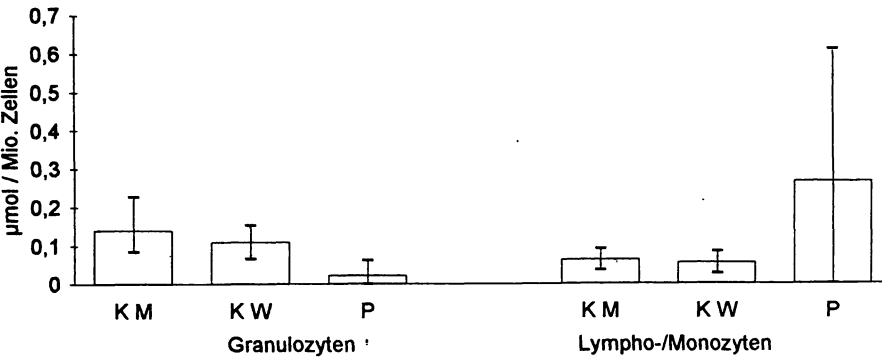


Tabelle 4. Konzentrationen von Selen und Zink bei akutem Nierenversagen

		Gesunde		Patienten mit akutem Nierenversagen	
		MW	s	MW	s
Selen					
Vollblut	µmol/l	1,037	0,118	0,79	0,13
Plasma	µmol/l	0,908	0,122	0,64	0,16
Thrombozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,00018	0,00019	0,01	0,015
Erythrozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,00011	0,00002	0,00020	0,000065
Granulozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,1259	0,0877	0,0226	0,039
Lympho-/Monozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,0931	0,0829	0,27	0,35
Zink					
Vollblut	µmol/l	75,4	5,16	79,35	14,01
Plasma	µmol/l	19,0	4,03	16,84	4,29
Thrombozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,0077	0,0041	0,199	0,33
Erythrozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,0127	0,001	0,033	0,008
Granulozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,3682	0,1202	0,305	0,316
Lympho-/Monozyten	µmol/10 ⁹ Zellen	0,4073	0,3256	0,534	0,382

Mit Ausnahme der Granulozyten fällt eine höhere Zink-Konzentration bei den niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen auf. Diese Unterschiede haben jedoch keine Signifikanz. Die Granulozyten hingegen zeigen einen signifikanten Anstieg bei akutem Nierenversagen ($p = 4 \cdot 10^{-5}$).

Diskussion

Präanalytik

Kontaminationen

Wenn zwischen den publizierten Referenz- und Meßwerten häufig erhebliche Divergenzen bestehen, so ist dies zumeist auf inakurate präanalytische Verfahrensweisen und auf Kontamination zurückzuführen [12]. Wichtige Aspekte bei der Bestimmung von Spurenelementen sind generell die Probennahme und das Transport- und Aufbewahrungsmedium. Berücksichtigt werden müssen vor allem Desinfektionsmittel. Art der Probennahme und Probenahmebestecke. Bei zu langer venöser Stauung kann es zur intravasalen Hämolyse mit einer Zink-Freisetzung aus den Erythrozyten kommen, ebenso bei zu starker Aspiration des Blutes in die Monovette [13]. Bei der Blutabnahme kommt es bei manchen Kanülen zum Übertritt von Metallionen ins Blut, was jedoch bei Selen und Zink von untergeordneter Bedeutung ist [14].

Probenmaterial

Bemühungen und Beweise, die Anwesenheit von Spurenelementen im Blut zur repräsentativen Beurteilung ihrer Rolle im menschlichen Organismus heranzuziehen, scheitern zumeist an der fehlenden Korrelation zu biochemischen und klinischen Daten. Blut stellt zwar eine Vermittlerfunktion zwischen den einzelnen Organen des Körpers dar, in vielen Fällen werden jedoch hierin keine relevanten Konzentrationsabläufe beobachtet, da sich die Veränderungen in zu kleinen Dimensionen bewegen oder der Körper die Spurenelement-Konzentrationen im Blut auf Kosten anderer Kompartimente konstant hält.

Trotz dieser bekannten Nachteile kommt man immer wieder auf die Analyse von Blutproben zurück [15], weil dies in der Laboratoriumsmedizin das klinisch relevanteste und daher am häufigsten untersuchte Körpermaterial ist. Allerdings werden in der Regel die Konzentration in nur einer Matrix (Vollblut, Plasma, Serum) bestimmt und daraus hinsichtlich der Spurenelemente unzulässigerweise auf den Versorgungsstatus des ganzen Körpers geschlossen. Wenn schon eine simultane Bestim-

mung in anderen, zumeist schwer zugänglichen Körpermaterialien, z.B. Organewebe, nicht möglich ist, so kann doch die Bestimmung in den verschiedenen Zellfraktionen des Blutes aufschlußreichere Informationen über das Schicksal einiger Spurenelemente geben. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Bestimmungen von Selen und Zink in sechs Blutbestandteilen parallel vorgenommen.

Probenaufarbeitung

Bisher beschriebene Zelltrennungsvorgänge [4, 5] leiden unter einer sichtbaren Zerstörung der Blutzellen beim Zentrifugationsvorgang mit Hämolyse und Agglutination der Zellen. Es ist dabei eine stark gesteigerte Fragilität der Blutzellen festzustellen. Im Hinblick auf die Isolierung der mononukleären Zellen, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten, ist häufig eine nicht zu beherrschende Verunreinigung der mononukleären Zellen mit Thrombozyten zu verzeichnen.

Die Konzentration der Spurenelemente in den Erythrozyten wurde im Gegensatz zu anderen Arbeiten nicht indirekt aus der Konzentration im Vollblut und Plasma, dem Hämatokrit und dem Hämoglobin errechnet, sondern direkt in den Erythrozyten gemessen und so die Gefahr der Addition und Potenzierung von Fehlern durch Verknüpfung vieler Schritte vermieden.

Selen

Analytik

Zur Selen-Bestimmung stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung: die direkte Bestimmung mit der Graphitrohrföfen-AAS oder die Bestimmung mittels der Hydrid-Technik. Bei der direkten Selen-Bestimmung treten jedoch größere Verluste an leichtflüchtigen Selen-Verbindungen auf [16]. Daher stellt die Hydrid-AAS die bei weitem genauere Methode dar [17] und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Dafür muß die Probe zunächst mit Säuren oxidiert und in einem zweiten Schritt zu Selen^{+IV} reduziert werden. Dieses Verfahren ermöglicht den Aufschluß auch schwer zugänglicher Selen-Verbindungen wie Selen-Methionin.

Referenzwerte

Die bei Gesunden ermittelten Selen-Werte zeigen in keinem der untersuchten Kompartimente eine alters- oder geschlechtsspezifische Verteilung [18]. Der Vergleich mit der Literatur kann zumeist eine Übereinstimmung bestätigen. Die meisten in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse beinhalten

jedoch leider nur Konzentrationen in Vollblut und Plasma. Im Plasma liegen die von uns gemessenen mittleren Selen-Werte von $0,81 \mu\text{mol/l}$ etwas unterhalb der Normalbereiche der meisten Autoren ($0,82$ bis $0,97 \mu\text{mol/l}$ [19, 20]). Die im Vollblut gemessenen Selen-Konzentrationen spiegeln die in der angegebenen Literatur gefundenen Werte gut wider. So liegt die in dieser Arbeit ermittelte durchschnittliche Selen-Konzentration im Vollblut bei $1,09 \mu\text{mol/l}$. (Literatur $0,73$ bis $1,3 \mu\text{mol/l}$). Die Selen-Konzentration in den Erythrozyten liegt bei Gesunden mit $0,00029 \mu\text{mol/Mio. Zellen}$ leicht über den Werten anderer Autoren ($0,000174 \mu\text{mol/Mio. Zellen}$) [8]. Für einen Vergleich der Meßergebnisse in den Thrombozyten steht kaum Literatur zur Verfügung. Der Mittelwert der Gesunden beträgt $0,0089 \mu\text{mol/Mio. Zellen}$ und liegt damit über Werten der Literatur ($0,00018 \mu\text{mol/Mio. Zellen}$) [19]. Über Selen-Konzentrationen in Leukozyten gibt es bisher keine Literatur. Zwischen den Konzentrationen im Vollblut und in den Erythrozyten besteht eine hochsignifikante Korrelation ($r = -0,441$, $p = 2 \cdot 10^{-5}$). Dies läßt sich leicht mit dem Vorhandensein großer Selen-Mengen in den Erythrozyten erklären.

Niereninsuffizienz

Bei den Patienten mit akutem oligo-anurischem Nierenversagen fällt im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Selen-Konzentration im Vollblut, dem Plasma, den Erythrozyten und den Granulozyten auf. So werden bei den Patienten im Vollblut $0,794$ gegenüber $1,09 \mu\text{mol/l}$ bei den Kontrollpersonen, im Plasma $0,643$ gegenüber $0,809 \mu\text{mol/l}$, in den Erythrozyten $2,0 \cdot 10^{-4}$ gegenüber $2,9 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/Mio. Zellen}$ und in den Granulozyten $0,023$ gegenüber $0,125 \mu\text{mol/Mio. Zellen}$ gemessen. Diese Unterschiede erreichen statistisch gesicherte Signifikanzen. Demgegenüber ist in den Thrombozyten und in den Monozyten eine erhöhte Selen-Konzentration festzustellen. Dabei weist jedoch lediglich der Konzentrationsunterschied in den Monozyten von $0,06$ im Vergleich zu $0,27 \mu\text{mol/Mio. Zellen}$ eine Signifikanz auf ($p = 3 \cdot 10^{-5}$). Man kann also bezüglich der Konzentrationen in Vollblut, Plasma und den Erythrozyten von einem generellen Selen-Mangel bei allen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz schon zu Beobachtungsbeginn sprechen.

Interessanterweise besteht zwischen der Einschränkung der Nierenfunktion, gemessen am Anstieg des Kreatininwertes, und der Selen-Konzentration im Plasma ein positiver Zusammenhang ($r = 0,529$, $p = 7 \cdot 10^{-6}$). Die Selen-Konzentration nimmt, ausgehend von einem erniedrigten Wert zu Beobachtungsbeginn, mit fortschreitender Niereninsuffizienz zu. Eine Anreicherung von Selen im Körper bei gestörter exkretorischer Funktion der Nieren

wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die Niere der Hauptausscheidungswege für Selen aus dem menschlichen Organismus ist. Schon geringe Änderungen in der glomerulären Filtrationsrate haben Veränderungen in der renalen Selen-Clearance zur Folge. Im Hinblick auf die eingeschränkte Urinausscheidung des oligurischen Patienten besteht ein direkter Bezug der Selen-Ausscheidung zum täglichen Urinvolumen. Zusätzlich können katabole Zustände mit vermehrtem Muskelabbau zu einem Anstieg der Plasma-Selen-Konzentration führen, da es zwar kein Selen-speicherndes Organ gibt, jedoch die Gesamtkörpermuskelmasse den Großteil (50 %) des Selen-Körperpools darstellt [21].

Die Empfehlungen zur Bestimmung des Selen sind so vielfältig wie divergent: Plasma, das häufigste Untersuchungsmaterial, zeigt hinsichtlich seiner Proteinabhängigkeit [22] insbesondere bei Proteinverlusten Probleme. Vorwiegend werden Erythrozyten und Vollblut [23] empfohlen. Urin ist ungeeignet [24]. Auch Thrombozyten sind als Marker für leichte Schwankungen im Selen-Haushalt empfindlich, ohne allerdings ein eindeutiges Korrelat zu einem physiologischen oder pathobiochemischen Vorgang zu haben [25].

Nach unserer Meinung ist die Bestimmung der Selen-Konzentration in den Granulozyten am ehesten als Marker für den Selen-Status repräsentativ. Dies wird an Hand der scharfen Trennung gegenüber Normalpersonen deutlich, die die Unterversorgung der Patienten mit Selen vor Beobachtungsbeginn am deutlichsten zeigt. Widersprechende Aussagen der Literatur beruhen darauf, daß keine getrennte Darstellung der einzelnen Leukozytenfraktionen vorgenommen wurde.

Zink

Analytik

Die Methode der Wahl für die Bestimmung des Zinks ist die flammenlose Graphitrohr-AAS. Zur Korrektur spektraler Interferenzen wird die Untergrundkompensation nach Zeeman eingesetzt. Diese Analytik zeichnet sich durch hohe Spezifität, gute Reproduzierbarkeit, geringe Probenmenge und eine sehr niedrige Nachweisgrenze aus. Letztere kann auch infolge zunehmender Störung durch Kontaminationen bei niedrigen Probenkonzentration als Nachteil der Graphitrohr-AAS angesehen werden. Nur durch ein äußerst sorgfältiges Arbeiten sind korrekte Ergebnisse zu erzielen. Die Impräzision der Meßergebnisse und die Abweichung vom Sollwert sind in sehr niedrigen Zink-Konzentrationsbereichen erheblich größer als bei Messungen relativ hoher Konzentrationen im Vollblut oder Plasma. Daher ist

das regelmäßige Mitführen von Referenzproben besonders wichtig.

Referenzwerte

Die ermittelten Referenzwerte für Zink im Vollblut stimmen mit der Literatur sehr gut überein (75,2 $\mu\text{mol/l}$ im Vergleich zu 72,94 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 71,49 $\mu\text{mol/l}$). Auch im Plasma finden sich in der Literatur Referenzwerte, die den eigenen Ergebnissen von 14,85 $\mu\text{mol/l}$ sehr nahe kommen (13,4 $\mu\text{mol/l}$) [26]. Im Vergleich zur Literatur [27] (0,0143–0,0286 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$) fanden wir in den Erythrozyten Referenzwerte von 0,0190 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$.

Auch der Zink-Gehalt der Granulozyten stimmt mit einem ermittelten Bereich von 0,379–0,467 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$ sehr gut mit der Literatur [28] überein (0,145–0,73 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$). Leichte Unterschiede bestehen bei der Bestimmung des Zinks mononukleärer Zellen. Der gefundene Mittelwert von 0,375 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$ liegt leicht über dem Bereich anderer Autoren [35, 29] (0,242 bis 0,332 bzw. 0,244–0,334 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$).

Niereninsuffizienz

Die Zink-Konzentrationen steigen bei akutem oligo-anurischen Nierenversagen mit Ausnahme der Granulozyten im Vergleich zu Gesunden in allen untersuchten Proben an. Im Vollblut und in den Monozyten ist diese Differenz jedoch nur tendenziell zu erkennen und erreicht keine statistisch gesicherte Signifikanz. Im Plasma weisen Patienten mit akuter oligo-anurischer Niereninsuffizienz einen signifikant höheren Zink-Gehalt von 16,84 $\mu\text{mol/l}$ auf (gegenüber 14,85 $\mu\text{mol/l}$ bei Gesunden) ($p = 0,024$). Auch in den Thrombozyten ist die Zink-Konzentration mit 0,1995 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$ bei den Patienten höher als bei Gesunden (0,0295 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$) ($p = 3 \cdot 10^{-8}$). Ebenfalls in den Erythrozyten liegt der Zink-Gehalt mit 0,033 gegenüber 0,019 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$ höher ($p = 5 \cdot 10^{-13}$). Hingegen fällt in den Granulozyten die mittlere Zink-Konzentration bei Patienten mit akutem Nierenversagen auf 0,305 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$ (gegenüber 0,422 $\mu\text{mol/Mio. Zellen}$ bei Gesunden) ($p = 4 \cdot 10^{-5}$).

Das auffallend gegenläufige Zink-Verhalten in den kernhaltigen Zellen im Vergleich zu den kernlosen Zellen ist entweder mit einem aktiven Abwehrmechanismus kernhaltiger Zellen gegen Metallintoxikationen [30] oder mit einer vermehrten Zink-Einschleusung in kernlose Zellen zu erklären. Letztere ist durch eine Anionenverschiebung [31] infolge des von einer metabolischen Azidose begleiteten oligo-anurischen Nierenversagens zu begründen. Daran beteiligt sind niedermolekulare Proteine, v. a. Metallothionein.

Beim akut oligo-anurischen Nierenversagen spielen sicherlich auch katabole Prozesse mit Abbau von Muskelmasse und Gewebe eine Rolle und bewirken, soweit möglich, eine bis um den Faktor 20 gesteigerte renale Zink-Exkretion. Dabei ist in der initialen und mittleren Phase die Plasma-Zink-Konzentration leicht erhöht. Ist der Exkretionsweg über die Niere blockiert, so kommt es zu einem Zink-Anstieg im Blut mit anschließender Umverteilung in andere Kompartimente. Die Fragilität der Erythrozyten bei der akuten oligo-anurischen Niereninsuffizienz unterstützt diesen Anstieg noch, da 75 und 80 % des Blut-Zink-Gehaltes in den Erythrozyten vorkommt und alleine durch eine Hämolyserate von nur 1 % die Plasma-Zink-Konzentration um etwa 15 % ansteigt.

Repräsentativste Aussagen zur Erfassung der Zink-Situation bei akutem Nierenversagen sind die vergleichenden Konzentrationsmessungen in zwei verschiedenen Zellarten: in den kernhaltigen Granulozyten und in den kernlosen Erythrozyten oder Thrombozyten. Ein echter Zink-Mangel spiegelt sich vor allem in den Granulozyten wider; Erythrozyten und Thrombozyten geben eher die Umverteilung infolge von Stoffwechseleränderungen wider. Lympho-/Monozyten verhalten sich indifferent. Von der Verwendung der Parameter Plasma und Vollblut kann keine relevante Beurteilung erwartet werden.

Literatur

1. Wastney ME, Aamodt RL, Rumble WF, Henkin RI (1986) Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Amer. J. Physiol.* 251, R 398–408
2. Bundesärztekammer (BÄK) (1988) Richtlinien zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien. *Lab. med.* 12, BDL 43–60
3. Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit (1983) OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP). *BAnz.* 42 a (2. 3. 1983)
4. Bro S, Pedersen NT, Jorgensen PJ, Horder M (1988) A method for determination of zinc in mononuclear leucocytes. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 2, 145–148
5. Schmitt Y, Moser V, Kruse-Jarres JD (1993) Zinc, copper and aluminium in the corpuscular components of peripheral blood in patients with pre-terminal and terminal failure. *Fresenius J. Anal. Chem.* 346, 852–858
6. Hansson L, Pettersen J, Eriksson L, Olin A (1989) Atomic absorption determination of selenium in human blood components. *Clin. Chem.* 35, 537–540
7. Iyengar GV, Woittiez J (1988) Trace elements in human clinical specimens: Evaluation of literature data to identify reference values. *Clin. Chem.* 34, 474–481
8. Oster O, Schmiedel G, Prellwitz W (1987) Correlation of blood selenium with hematological parameters in West German adults. *Biol. Trace Elem. Res* 15, 47–81

9. Navarro JA, Parra OE, Garcia R, Rodriguez-Iturbe B, Granadillo VA, Rubio D, Romero RA (1989) Trace metal levels during hemodialysis in patients with chronic renal failure. *Trace Elem. Med.* 6: 70-74
10. Küllerich S, Christensen MS, Naestoft J, Christiansen C (1980) Determination of zinc and proteins in 104 normal subjects. *Clin. Chim. Acta* 105: 231
11. Peretz A, Nève J, Jeghers O, Leclercq N, Praet J, Vertongen F, Famaey J (1991) Interest of zinc determination in leucocyte fractions for the assessment of marginal zinc status. *Clin. Chim. Acta* 203: 35-46
12. Versieck J (1985) Trace elements in human body fluids and tissues. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 22: 97-184
13. Reimold W, Deborah JB (1978) Detection and elimination of contaminations interfering with the determination of zinc in plasma. *Clin. Chem.* 24: 675-680
14. Hall M, Loscombe S, Taylor A (1988) Trace element contamination from blood specimen containers. *Trace Elements in Medicine* 5: 126-129
15. Iyengar GV, Kollmer WE (1986) Some aspects of sample procurement from human subjects for biomedical trace element research. *Trace Elem. Med.* 3: 25-33
16. Welz B, Melcher M, Schlemmer G (1983) Determination of selenium in human blood serum. Comparison of two atomic absorption spectrometric procedures. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 316: 271-276
17. Welz B, Wolynetz M, Verlinden M (1987) Interlaboratory trial on the determination of selenium in lyophilized human serum, blood and urine using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Pure Appl. Chem.* 59: 927-936
18. Rütgauer M, Schmitt Y, Kruse-Jarres JD (1992) Physiologie und Pathophysiologie des Selen. *Therapiewoche* 44: 2584-2588
19. Hansson L, Pettersson J, Eriksson L, Olin A (1989) Atomic absorption determination of selenium in human blood components. *Clin. Chem.* 35: 537-540
20. Kostakopoulos A, Kotsalos A, Alexopoulos J, Sofras F, Deliveliotis C, Kallistratos C (1989) Serum selenium levels in healthy adults and its changes in chronic renal failure. *Int. Urol. Nephrol.* 22: 397-401
21. Oster O, Prellwitz W (1990) The renal excretion of selenium. *Biol. Trace Elem. Res.* 24: 119-146
22. Akesson B (1987) Plasma selenium in patients with abnormal plasma protein patterns. *Trace Elem. Med.* 4: 77-79
23. Nève J (1991) Methods in Determination of Selenium States. *J. Trace Electrolytes Health Dis.* 5: 1-17
24. Oster O, Prellwitz W (1990) The renal excretion of selenium. *Biol. Trace Elem. Res.* 24: 119-146
25. Kiern J (1987) Selen und Thrombozyten. *VitaMin-Spur* 2: 14-24
26. Anttila H, Salo M, Nantö V, Brenner R, Kirvelä O, van Riemsdijk J (1992) Mononuclear and polymorphonuclear cell zinc and serum trace element concentrations in healthy adults. *Trace Elem. Med.* 9: 171-175
27. Holtmeier H (1991) Das Zink-Mangelsyndrom beim Menschen. In: „Zink – Biochemie, Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Zinkstoffwechsels des Menschen“ (Hrsg. H. Holtmeier und J. D. Kruse-Jarres), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1991, 101-121
28. Peretz A, Nève J, Jeghers O, Leclercq N, Praet J, Vertongen F, Famaey J (1991) Interest of zinc determination in leucocyte fractions for the assessment of marginal zinc status. *Clin. Chim. Acta* 203: 35-46
29. Preez MJ du, Lockett CJ (1991) Effect of clopamide, a thiazide diuretic, on copper and zinc levels in hypertensive patients. *J. Am. Coll. Nutr.* 10: 34-37
30. Baginski B, Grube B (1991) Einfluß von Blei, Zink und Cadmium auf die zelltoxische Wirkung humaner polymorphkerniger Leukozyten am Beispiel von Hefezellen. *Zentrallbl. Hyg. Umweltmed.* 191: 28-35
31. Kalfakakou V, Simons T (1990) Anionic mechanisms of zinc uptake across the human red cell membrane. *J. Physiol* 421: 485-497