

Die Bestimmung von Magnesium und den Spurenelementen Selen, Zink, Kupfer und Aluminium in korpuskulären Bestandteilen des Blutes bei Patienten mit akutem oligo-anurischem Nierenversagen

The determination of magnesium and the trace elements selenium, zinc, copper and aluminium in the corpuscular components of blood in patients with acute oligo-anuric renal failure

P. Beck^{1,2,3}

Zusammenfassung

Im menschlichen Organismus sind Mineralstoffe und Spurenelemente für den geregelten Ablauf lebensnotwendiger Stoffwechselfunktionen essentiell. Ihre quantitative Bestimmung erfordert eine spezielle und leistungsfähige Technik, die höchsten Qualitätsansprüchen gerecht wird. Von der alleinigen Verwendung der Probenmaterialien Vollblut und Plasma muß dringend abgeraten werden. Daher wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, auch stark vorgeschädigte Zellen zu isolieren, um Veränderungen im Elementbestand des Organismus zuverlässig bestimmen zu können. Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Mono/Lymphozyten können nahezu fremdzellfrei in die Analyse mit einbezogen werden. Am Beispiel des akuten oligo-anurischen Nierenversagens konnten die rasch einsetzenden Änderungen der einzelnen Elementkonzentrationen in Vollblut, Plasma und korpuskulären Blutbestandteilen beobachtet und dokumentiert werden. Zum Vergleich wurde ein Kollektiv gesunder Blutspender mit derselben Analysenmethode parallel untersucht. Die ermittelten Änderungen der Elementkonzentrationen wurden in Bezug zu wichtigen pathophysiologischen Prozessen des Krankheitsbildes gebracht.

Schlüsselwörter

Magnesium – Spurenelemente – Blutzellen – Akutes Nierenversagen – Referenzwerte

Summary

Minerals and trace elements are essential for the proper functioning of vital metabolic reactions in the human organism. Their quantitation requires specific and efficient techniques that meet the highest quality standards. The exclusive use of blood or plasma is urgently disapproved. Therefore, a method was developed that makes it possible to isolate even heavily deteriorated blood cells for the reliable assessment of the element status of the organism. Erythrocytes, platelets, granulocytes and mono-/lymphocytes prepared nearly free from contamination by other blood cells can be integrated into the analysis. As an example, the changes in individual elements that develop quickly in acute oligo-anuric renal failure were observed and documented with whole blood, plasma and corpuscular compounds of blood. For comparison, a group of healthy blood donors was investigated in parallel using the same analytical procedures. The observed changes of element concentrations were related to important pathophysiological processes of the disease.

¹ Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Katharinenhospital Stuttgart (Ärztl. Direktor: Prof. Dr. J.D. Kruse-Jarres)

² Korrespondenzadresse: cand. med. P. Beck, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Katharinenhospital Stuttgart, Kriegsbergstraße 60, D-70174 Stuttgart. Fax x49-711-278-4809

³ Die Arbeit enthält Teile der Dissertationsschrift (Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen) von P. Beck, Träger des Förderpreises 1995 der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin

Key words

Magnesium – trace elements – blood cells – acute renal failure – reference values

Einleitung

Im menschlichen Organismus sind Mineralstoffe und Spurenelemente für den geregelten Ablauf lebensnotwendiger Stoffwechselfunktionen von großer Bedeutung. Ihre

Funktion üben diese Elemente dabei sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene aus. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in kleinen Konzentrationen in allen Zellen des lebenden Organismus und der Manifestation von pathologischen Reaktionsabläufen im Stoffwechsel bei Entgleisung der physiologisch notwendigen Elementkonzentrationen zählen sie zu den essentiellen Bestandteilen des Körpers.

Das Erfassen der zum Teil sehr geringen Konzentration der Elemente in den verschiedenen Verteilungskompartimenten erfordert eine spezielle und leistungsfähige Analysentechnik, die höchsten Qualitätsansprüchen gerecht wird. Die korrekte Anwendung der einzelnen Analysemethoden sowie das Vermeiden jeglicher Kontamination sind unabdingbare Voraussetzungen hierfür.

Eine Vielzahl von Krankheiten kann bereits eindeutig auf Störungen des Spurenelementhaushalts zurückgeführt werden. Die bisher in vielen Fällen angewandte Bestimmung von Plasma- oder Vollblutproben zur Festlegung des Elementstatus im Organismus erwies sich jedoch oft als ungenügend. Bedenkt man die Mittlerfunktion von Plasma zwischen den einzelnen Kompartimenten, werden diese Probleme verständlich.

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Kompartimente parallel zu erfassen und den Haushalt mehrerer Elemente gleichzeitig zu untersuchen. Als zu untersuchende Elemente wurden Magnesium, Selen, Zink, Kupfer und Aluminium ausgewählt. Die Tauglichkeit verschiedener peripherer Blutzellen, Vollblut und Plasma als Indikator für Veränderungen im Elementbestand des Organismus wurde vergleichend untersucht. Bisher gibt es sehr wenig Studien über das Verhalten der Mineralstoffe und Spurenelemente bei akuten Prozessen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit 20 Patienten mit akutem oligo-anurischem Nierenversagen über den Zeitverlauf von einer Woche untersucht. Das plötzlich einsetzende Ausscheidungsdefizit über die Niere ermöglicht das Verhalten derjenigen Elemente, die vornehmlich renal eliminiert werden, näher zu untersuchen. Zudem können Zusammenhänge zwischen dem Krankheitsbild und Elementen, die Einfluß auf die Nierenfunktion nehmen, genau beobachtet werden. Um möglichst exakte Vergleichswerte für die Beurteilung der bei den Patienten ermittelten Elementkonzentrationen zu erhalten, wurde parallel mit derselben Analyseverfahren ein Kollektiv von 35 gesunden Blutspendern erfaßt.

Abkürzungen:

AAS	= Atomabsorptionsspektrophotometrie
Hb	= Hämoglobin
Hkt	= Hämatokrit
I.E.	= Internationale Einheit(en)
K.N.	= Kein Nachweis
MCV	= Mittleres Zellvolumen
NWG	= Nachweisgrenze
SDS	= Natriumdodecylsulfat

Damit überhaupt Untersuchungen an den korpuskulären Blutbestandteilen möglich sind, mußte eine Methode entwickelt werden, die es gestattet, auch stark vorgeschädigte Zellen isolieren zu können. Ein wesentliches Ergebnis dieser Studie ist die Erarbeitung einer Methode, die eine saubere, annähernd fremdzellfreie Fraktionierung der Leukozyten erlaubt. Hierdurch konnten Granulozyten und mononukleäre Zellen ohne den Zusatz kontaminierender Substanzen isoliert werden.

Material und Methode

Patientengut

Das Patientengut setzte sich aus 20 Patienten mit akutem oligo-anurischem Nierenversagen zusammen (10 Männer, 10 Frauen). Bei allen Patienten wurde dreimal eine Untersuchung von Blutproben durchgeführt. Die erste Blutabnahme erfolgte sofort nach Diagnosestellung noch vor einer etwaigen Dialysebehandlung, die weiteren jeweils 2 und 4 Tage nach der ersten Probengewinnung. Um eine möglichst homogene Patientengruppe zu bekommen, wurden folgende Ausschlußkriterien festgelegt: Leberzirrhose, Cholestase, Hepatitis, Polyarthrit, Diabetes mellitus, exokrine Pankreasinsuffizienz, Menkes Syndrom, Morbus Wilson, Verbrennungen, Therapie mit Metallchelatoren, Einnahme von Mineralstoff- oder Spurenelementpräparaten. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 52 (Streuung $\pm 15,7$) Jahre.

Kontrollgruppe

Das Kontrollkollektiv wurde von 35 gesunden Männern und Frauen gebildet. Das mittlere Alter betrug $36,9$ (Streuung $\pm 11,8$) Jahre. Um Einflüsse durch Erkrankungen oder Medikamente auszuschließen, wurden für die Gruppe der Blutspender folgende Ausschlußkriterien festgelegt: Einnahme von Medikamenten, Mineralstoff- oder Spurenelementpräparaten, Erstspender, Erkrankungen, die unter die Ausschlußkriterien der Patientengruppe fallen, jede Art von akuten Prozessen oder Erkrankungen wie Erkältung, Diät oder kurz zurückliegende Auslandsaufenthalte, Operationen innerhalb der letzten 4 Wochen.

Versuchsbedingungen

Um möglichst optimale Versuchsbedingungen zu erzielen, wurde ein exakter Zeitplan bei der Probengewinnung eingehalten. Mit Ausnahme der ersten Blutabnahme bei den Patienten, bei denen die erste Probengewinnung sofort nach Diagnosestellung erfolgte, wurden alle übrigen Blutentnahmen in der Patienten- und

Kontrollgruppe morgens in der Zeit zwischen 8 und 9 Uhr durchgeführt. Die Blutproben wurden daraufhin auf Zimmertemperatur abgekühlt und sofort der Weiterverarbeitung zugeführt. Die Zeit zwischen Probengewinnung und Beginn der Probenaufarbeitung betrug maximal 1,5 Stunden. Die gewonnenen Zellfraktionen wurden bei -80°C tiefgefroren. Die Vorbereitung der Proben zur Bestimmung der Elementkonzentration und die anschließende Analyse erfolgten vorwiegend abends und nachts, um ein Minimum an Kontamination zu erzielen.

Probengewinnung

Bei jeder Blutentnahme wurden jeweils 20 ml venöses Vollblut mit Stahlkanülen in Lithiumheparin-haltige Monoventen aufgezogen. Die Zellen wurden hiernach mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierzu wurden alle beteiligten Reagenzien und Blutproben auf Zimmertemperatur gebracht. Der Zellgehalt, bzw. die Reinheit der so gewonnenen Proben wurde jeweils sofort nach der Isolierung am automatischen Zellzähler ermittelt (Sysmex K 1000, TOA Medical Electronics). Bei den einzelnen Zentrifugationsschritten war auf eine langsame Anlaufzeit der Zentrifuge von drei Minuten und auf das Lösen der Bremse zu achten.

Auftrennung der Blutproben

Vollblut und Plasma

Aus der Nativblutprobe wurden nach vorsichtigem Durchmischen 1,5 ml Vollblut in ein Polypropylenhütchen abgefüllt und der Zellgehalt bestimmt.

Zellfreies Plasma wurde durch Zentrifugieren von jeweils 1,5 ml Vollblut in vier Polypropylenröhrchen bei 2300g über 5 Minuten und erneute Zentrifugation bei 10000g über 5 Minuten gewonnen. Der Bodensatz wurde mit Waschlösung (pH 7,4, 142 mmol/l NaCl, 0,33 mmol/l Na_2HPO_4 , 0,5 mmol/l Glucose) auf 1,5 ml aufgefüllt und für die spätere Leukozytenisolierung aufbewahrt.

Isolierung von Thrombozyten

Für die Thrombozytengewinnung wurden genau 4 ml des Trennmediums Nycoprep™ (Dichte 1,063 g/ml, Nycomed Pharma) in ein Zentrifugationsgefäß vorgelegt, vorsichtig tropfenweise mit 6 ml Vollblut überschichtet und bei 390g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Thrombozyten, schwimmend in einer Wolke in der oberen Phase, wurden behutsam abpipettiert und in Polypropylenhütchen überführt. Nach Verwerfen des größten Teils der übrigen flüssigen Phase wurde der Bodensatz resuspendiert und für die Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Isolierung von Leukozyten

Für die Isolierung von Leukozyten wurde der resuspendierte Bodensatz aus der Thrombozytengewinnung mit großer Sorgfalt über 4 ml des Trennmediums Polymorphprep™ (Dichte 1,113 g/ml, Nycomed Pharma) geschichtet und bei 530g für 30 Minuten zentrifugiert. Die beiden im Überstand schwimmenden Wolken wurden vorsichtig getrennt abpipettiert. Hierbei entsprach die obere hellere Wolke den mononukleären Zellen, die untere rötlich schimmernde Schicht den Granulozyten. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden auf 6 ml mit Waschlösung aufgefüllt. Der restliche Überstand und die oberste Schicht des Bodensatzes wurden verworfen. Der übrige Bodensatz wurde für die Erythrozytengewinnung aufbewahrt.

Die Granulozytensuspension wurde mehrmals unter unterschiedlichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Bodensatz jeweils mit Waschlösung aufgefüllt (150g, 65g und 35g über jeweils 10 Minuten). Die so erhaltene gereinigte Zellsuspension wurde auf ein Volumen von 1,5 ml verdünnt.

Für die Gewinnung der mononukleären Zellen wurde die Suspension der Mono-/Lymphozyten und die Zellsuspension aus der Plasmagewinnung über 4 ml Nycoprep™ geschichtet und bei 390g über 15 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes bis auf die oberste Schicht wurde der Bodensatz über 3 ml Lymphoprep™ (Dichte 1,077 g/l, Nycomed Pharma) geschichtet und bei 2000g 20 Minuten zentrifugiert. Die Wolke aus mononukleären Zellen wurde abpipettiert und mit 3 ml bidestilliertem Wasser genau 40 Sekunden versetzt. Hierauf wurden mit 3 ml 1,8 % NaCl plasmaitone Verhältnisse hergestellt. Anschließend wurde die Suspension bei 100g über 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Bodensatz auf 1,5 ml mit Waschlösung aufgefüllt.

Isolierung von Erythrozyten

Um eine Suspension fremdzellfreier Erythrozyten zu erhalten, wurde der Bodensatz aus der Leukozytengewinnung über 3 ml Nycoprep™ geschichtet und bei 390g 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Bodensatz über 3 ml Polymorphprep™ geschichtet und bei 530g 30 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand großzügig abpipettiert und verworfen wurde, erfolgte eine viermalige Zentrifugation bei 100g über 10 Minuten. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abpipettiert und der Bodensatz mit Waschlösung auf 1,5 ml aufgefüllt.

Probenaufbereitung für die Analyse

Vor der Analyse der Proben wurden diese einem Verdauungsprozeß unterzogen. Damit wurde eine Homogenisierung der Proben erreicht, ferner konnten Spurenelemen-

te, die an Proteine gebunden waren, der Analyse leichter zugeführt werden. Hierfür wurden die Vollblutproben mit 60 µl Proteinase K und 15 µl SDS versetzt. Zu allen anderen Proben wurden 30 µl Proteinase K und 15 µl SDS zugegeben. Alle Proben wurden anschließend bei 37 °C im Inkubationsschrank genau 36 Stunden aufbewahrt.

Quantifizierung von Magnesium

Für die Messung des Elements Magnesium wurden von allen zu analysierenden Proben 100 µl mit 4900 µl 0,1 % Salzsäure (Merck) versetzt und so eine Verdünnung von 1:50 erzielt.

Zum Erstellen der Kalibrationsgeraden wurden verschiedene Standardlösungen hergestellt in einer jeweiligen Verdünnung von 1:50. Als Ausgangssubstanz diente eine Merck Magnesium-Stammlösung der Konzentration 1 mg/l.

Als Blindwert bei der Magnesiummessung diente eine 0,1 % Salzsäurelösung. Die Analyse aller verwendeten Materialien ergab keine nachweisbare Kontamination mit Magnesium. Für die Analyse der Proben kam der Flammen-Atomabsorptionsspektrometer 1.100 B, der Proben-dosierautomat AS-90 und der Drucker EX-800 (Perkin-Elmer) zur Anwendung.

Als Lichtquelle diente eine Hohlkathodenlampe, die Gasversorgung erfolgte mit Acetylen und Luft. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte über die Peakfläche.

Quantifizierung von Selen

Vor Beginn der Selenbestimmung mußten alle Proben einem Aufschlußprozeß unterzogen werden. In einem ersten Schritt wurde 0,194 ml Probenmaterial mit 0,5 ml 65 % Salpetersäure (Merck) und 0,25 ml 30 % Wasserstoffperoxid (Merck) versetzt. Anschließend erfolgte die Oxidation von organischem in anorganisches Selen mittels Mikrowellenaufschluß (Mikrowellenaufschlußsystem MLS-1200 Büchi). Selen lag nun als sechswertiges Kation vor. In einem zweiten Schritt wurde der abgekühlten Probe 1,0 ml 30 % Salzsäure zugesetzt und diese im Mikrowellengerät entsprechend dem ersten Schritt behandelt. Hierdurch liegt Selen in seiner vierwertigen Form vor. Bei beiden Reaktionsschritten war das Energieprogramm der Mikrowelle identisch (einmal 2,5 Minuten bei 25 % der Gesamtenergie von 1200 Watt und zweimal 5 Minuten bei 50 %). Vor der Selenbestimmung der aufgeschlossenen Probe erfolgte eine Verdünnung. Hierzu wurden 1,5 ml Probe mit 2,5 ml 30 % Salzsäure und 0,2 % Entschäumer versetzt. Zur Kalibration wurden verschiedene Verdünnungsstufen einer Selenstammlösung der Firma Merck hergestellt. Auf die Verwendung einer Blindlösung konnte durch die Abtrennung des zu untersuchenden Elements von Matrixbestandteilen verzichtet werden.

Die Selenbestimmung erfolgte mittels Hydrid-Atomabsorptionsspektrometrie (Fias 200, Perkin-Elmer). Hierfür wurde mit Hilfe eines Fließinjektionsventils eine genau definierte Menge der aufgeschlossenen Probe in einen kontinuierlich fließenden Flüssigkeitsstrom eingebracht. Durch Zusammentreffen der Probe mit einer reduzierenden Natriumtetrahydroborat-Lösung entstanden aus vierwertigem Selen Selenhydride. Diese wurden mit einem Trägerstrom aus Argon in eine beheizte Quarzküvette transportiert, die im Strahlengang einer Hohlkathodenlampe lag.

Quantifizierung von Zink, Kupfer und Aluminium

Für die Kalibrierung wurde bei der Bestimmung aller drei Elemente das Kontrollserum Seronorm™ (Nycomed Pharma) verwendet. Als Blindlösung diente je nach Probenfraktion ein unterschiedliches Gemisch der jeweils zugesetzten Substanzen. Die Blindlösung fand bei der Bestimmung von Zink, Kupfer und Aluminium Verwendung und wurde in den Proben entsprechendem Verhältnis verdünnt.

Folgende Blindlösungen fanden Verwendung:

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

Bei allen Elementen erfolgten unterschiedliche Verdünnungsschritte der Proben mit 0,02 % Triton-X-Lösung. Die Verdünnung beim Element Zink betrug bei Vollblut 1:100, bei Plasma und Thrombozyten 1:20 und bei Erythrozyten 1:100. Die Leukozytenfraktionen wurden der Analyse unverdünnt zugeführt. Für die Bestimmung des Elements Kupfer wurden folgende Probenverdünnungen mit 0,02 % Triton X gewählt: Bei Vollblut und Plasma 1:20, bei Thrombozyten 1:10, bei Erythrozyten 1:5. Die Leukozytenfraktionen wurden unverdünnt verwendet.

Beim Element Aluminium wurden folgende Verdünnungsverhältnisse gewählt: Bei Vollblut, Thrombozyten und Erythrozyten 1:9, bei Plasma 1:3. Auch hier wurden die Leukozytenproben nicht verdünnt.

Für die Quantifizierung der Elemente Zink, Kupfer und Aluminium wurde die Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie angewendet (Atomabsorptionsspektrometer Zeeman/3030, Perkin-Elmer). Mit Hilfe eines automatischen Probendosierautomates (AS-60) wurde ein genau

definiertes Volumen von 20 µl der vorbereiteten Probenlösung in ein pyrolytisch beschichtetes Graphitrohr ohne Plattform eingebracht. Nach einem elementspezifischen Programmablauf wurde durch stufenweises Erhitzen zuerst eine Verflüchtigung der Lösungsmittel erzielt. Bei weiterer Hitzezufuhr wurden Begleitsubstanzen, die Matrix, verascht. Argongas sorgte für eine Entfernung der entstehenden Matrixdämpfe und verhinderte eine Interaktion von Sauerstoff mit der Probe. Im letzten Schritt, der Atomisierung, erfolgte die thermische Dissoziation der Probe. Der Meßvorgang vollzog sich im Licht der jeweiligen Hohlkathodenlampe, die Auswertung des Meßergebnisses erfolgte wiederum anhand der Peakfläche.

Qualitätssicherung

Kontamination

Es erfolgte eine peinlich genaue Untersuchung sämtlicher verwendeter Materialien und Reagenzien sowie der Analysengeräte auf Verunreinigung mit den untersuchten Elementen hin. Die Analysen auf Kontamination erfolgten in Form von Wiederholungsmessungen und wurden mit jeder neuen Charge der betreffenden Utensilien und Substanzen durchgeführt.

Präzision

Um die Genauigkeit der Meßmethode zu erfassen, wurden in bestimmten Intervallen Proben exakt gleicher Konzentration in wiederholter Folge gemessen. Bei einem Variationskoeffizienten von größer 5 % wurde eine ausgiebige Reinigung und Überprüfung der Analysengeräte und aller verwendeten Utensilien und Reagenzien vorgenommen.

Richtigkeit

Nach jeder neuen Kalibration der Analysengeräte und ebenfalls in regelmäßigen Abständen während der Meßvorgänge wurde die Richtigkeit anhand verschiedener Kontrollsubstanzen überprüft. Verwendung fanden die Kontrollmedien Seronorm™ Serum und Whole Blood (Nycomed Pharma), M+D Monitrol I und II (Baxter GmbH) sowie Lyphochek Level 1 und 2 (BioRad). Ab einem Variationskoeffizienten größer 5% zwischen ermitteltem und theoretischem Wert wurde eine erneute Kalibration sowie eine Überprüfung der Analysengeräte auf Verunreinigung oder Abnutzung vorgenommen.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist nach der International Federation of Chemistry definiert als das kleinste Ergebnis, das bei einer gegebenen Wahrscheinlichkeit von einem Leerwert

unterschieden werden kann [1]. Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgte nach folgender Formel:

$$NWG = \text{Leerwert} + 3\sigma$$

Statistik

Zur Auswertung der Meßergebnisse wurden Mittelwert, Median, Maximum, Minimum, Standardabweichung und Varianz bestimmt. Bei den Patienten erfolgte eine getrennte Auswertung der einzelnen Untersuchungstage sowie eine Gesamtauswertung. Für den Vergleich der linearen Abhängigkeit der Elementkonzentrationen in den einzelnen Kompartimenten des Blutes wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient verwendet. Das einseitige Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Für den Vergleich der Parameter zwischen Patienten und Gesunden sowie der Untersuchung auf Abhängigkeit vom Geschlecht wurde der U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon angewendet (Paardifferenztest). Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Der Vergleich der Meßergebnisse der einzelnen drei Tage untereinander in der Gruppe der Patienten erbrachte keinen nennenswerten signifikanten Unterschied. Da auch der Vergleich der drei einzelnen Blutentnahmetermine bei den Patienten mit den Werten der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Vergleich der zusammengefaßten Meßwerte zeigte, wurden die drei Einzelmeßwerte in den Darstellungen zusammengefaßt.

Ergebnisse

Optimierung der Zellisolierung

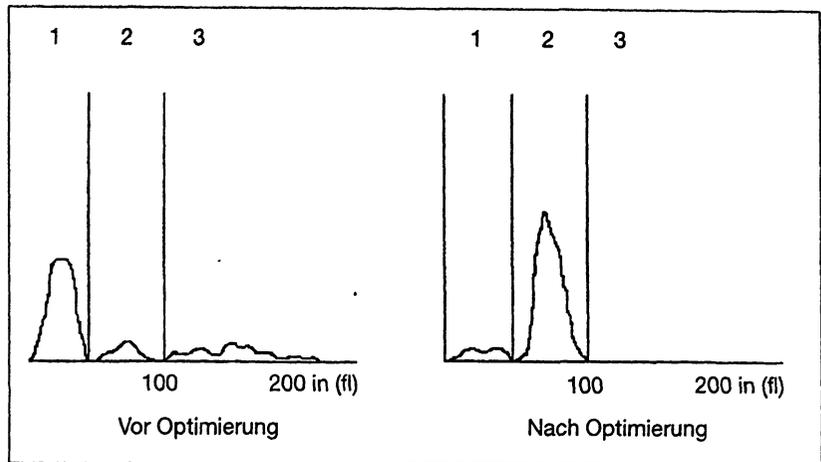
Die bisher zur Verfügung stehende Methode der Zellisolierung und -Auftrennung aus Vollblut, war für die Aufarbeitung der Blutproben der Patienten mit akutem Nierenversagen ungeeignet. Anhand zahlreicher Experimente wurde eine neue Methode der Zellseparation erarbeitet. Es konnte dadurch eine gute Trennung der Zellfraktionen erreicht werden, was am Beispiel der Isolierung der Leukozytenfraktionen deutlich wird (s. Abb. 1 und Tabelle 1).

Tabelle 1. Einfluß der Optimierung der Trennmethode auf die mittlere Zellzahl (Standardabweichung).

	Granulozyten/nl	Mononukl. Zellen/nl
<i>Alte Methode</i>		
Kontrollgruppe	1,31 (1,12)	0,50 (0,9)
Patienten	5,60 (2,8)	0,20 (0,1)
<i>Neue Methode</i>		
Kontrollgruppe	2,45 (1,42)	1,74 (0,9)
Patienten	11,60 (10,09)	1,37 (0,85)

1 = Thrombozyten
2 = Mononukleäre Zellen
3 = Granulozyten

Abb. 1. Optimierung der Zelltrennung: Isolierung von mononukleären Zellen. Unterschied zwischen herkömmlicher Trennmethode und optimierter Zellisolierung.



Nachweisgrenze

Die gefundenen Nachweisgrenzen sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2. Nachweisgrenzen der untersuchten Elemente im Plasma. Angaben in mmol/l.

Element	Nachweisgrenze
Magnesium	0,95
Selen	0,06
Zink	0,051
Kupfer	0,028
Aluminium	0,063

Kontamination

Alle verwendeten Materialien und Substanzen, die im Verlauf des Arbeitsprozesses verwendet wurden, sind auf mögliche Kontamination untersucht worden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind bei der Auswertung der Meßergebnisse und bei der Berechnung der Elementkonzentration berücksichtigt worden. Zur Beurteilung der Kontamination der verwendeten Materialien wurden diese 30 Minuten mit 0,2 % Salzsäure inkubiert und anschlie-

Tabelle 3. Ergebnisse der Kontaminationsprüfungen.

Material	Ergebnis
Probeabnahmesystem	Zink 0,50 µmol/l
	Kupfer 0,71 µmol/l
	K.N.
Proben-, Meß- und Zentrifugationsgefäße	Zink 0,15 µmol/l
	Aluminium 1,12 µmol/l
	15 I.E. Heparin Aluminium ca. 3,36 x 10 ⁻⁶ µmol
Trennmedien	K.N.

ßend auf Verunreinigung hin untersucht. Alle verwendeten Reagenzien und Lösungen wurden direkt gemessen. Die Ergebnisse der Kontaminationsprüfung sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Präzisionsergebnisse

Repräsentative Daten zur Präzision der Methoden sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. Beispiele für ermittelte Variationskoeffizienten bei jeweils zehn aufeinanderfolgenden Messungen derselben Probe. Angegeben sind Sollwert, Mittelwert, Maximum, Minimum, Standardabweichung (s), Variationskoeffizient (vk).

	Magnesium (mmol/l)	Selen (µmol/l)	Zink (µmol/l)	Kupfer (µmol/l)	Aluminium (µmol/l)
Sollwert	1,000	1,300	26,000	21,000	2,900
Mittelwert	1,001	1,311	26,073	21,320	2,953
Maximum	1,056	1,397	27,10	22,700	3,150
Minimum	0,95	1,218	24,89	20,20	2,790
s	0,0324	0,050	0,709	0,690	0,111
Vk	3,23	3,81	2,720	3,230	3,760

Spurenelementkonzentration der Patienten

Aufgrund der zum Teil gravierenden Einflüsse des Krankheitsbildes auf die Konzentrationen der Elemente Magnesium, Selen, Zink, Kupfer und Aluminium in den einzelnen Kompartimenten macht es wenig Sinn die ermittelten Ergebnisse getrennt für Männer und Frauen zu betrachten. In der Tabelle 5 sind daher die Resultate der Bestimmung der einzelnen Elemente für beide Geschlechter zusammen aufgeführt. Angegeben sind jeweils der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung (s).

Tabelle 5. Elementkonzentrationen bei der Patientengruppe.

Probenmaterial, Einheit	Mittelwert	Median	s
Magnesium			
Vollblut, mmol/l	1,69	1,69	0,28
Plasma, mmol/l	1,04	1,05	0,25
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	6,34	4,89	6,32
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,27	0,25	0,06
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	3,67	3,28	1,44
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	7,83	5,92	6,32
Selen			
Vollblut, $\mu\text{mol}/\text{l}$	0,79	0,79	0,13
Plasma, $\mu\text{mol}/\text{l}$	0,64	0,66	0,16
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,01	0,0045	0,015
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	2,03E-04	1,89E-04	6,49E-05
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,023	0,014	0,039
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,27	0,14	0,35
Zink			
Vollblut, $\mu\text{mol}/\text{l}$	79,35	77,55	14,01
Plasma, $\mu\text{mol}/\text{l}$	16,84	16,2	4,29
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,199	0,085	0,33
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,033	0,031	0,008
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,305	0,205	0,316
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,534	0,471	0,382
Kupfer			
Vollblut, $\mu\text{mol}/\text{l}$	13,29	12,65	3,79
Plasma, $\mu\text{mol}/\text{l}$	14,33	14,10	3,34
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,052	0,048	0,032
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,001	9,99E-04	8,3E-04
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,014	0,009	0,015
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,159	0,018	0,182
Aluminium			
Vollblut, $\mu\text{mol}/\text{l}$	0,366	0,306	0,194
Plasma, $\mu\text{mol}/\text{l}$	0,516	0,464	0,220
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,00265	0,00115	0,00445
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	9,33E-05	6,07E-05	7,25E-05
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,040	0,018	0,114
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,043	0,015	0,060

Zusammenhang zwischen der Elementkonzentration und den hämatologischen Parametern Hb, Hkt und MCV

Magnesium

Zwischen MCV und den Magnesiumkonzentrationen in Vollblut, Plasma und Thrombozyten bestehen positive Korrelationen ($r=0,268$, $p=0,019$; $r=0,251$, $p=0,027$; $r=0,248$, $p=0,028$). Ebenfalls läßt sich ein positiver Bezug zwischen der Magnesiumkonzentration im Vollblut und dem Hämoglobingehalt herstellen ($r=0,381$, $p=0,001$).

Zink

In Bezug auf den Hämoglobingehalt des Blutes besteht eine positive Korrelation zum Zinkgehalt des Vollblutes und eine negative Korrelation zum Zinkgehalt der Granulozyten ($r=0,389$, $p=0,001$; $r=-0,289$, $p=0,013$).

Aluminium

Wichtige Bezüge werden beim Vergleich der Aluminiumgehalte von Vollblut und Plasma mit dem MCV erkennbar. So nimmt das Erythrozytenvolumen bei zunehmender Aluminiumkonzentration in Vollblut oder Plasma ab ($r=-0,246$, $p=0,029$; $r=-0,796$, $p=1E-14$). Der Hämoglobingehalt des Blutes hängt von einer niedrigen Aluminiumkonzentration in den Kompartimenten Vollblut, Plasma, Erythrozyten und Granulozyten ab ($r=-0,232$, $p=0,037$; $r=-0,400$, $p=8E-4$; $r=-0,239$, $p=0,003$; $r=-0,305$, $p=0,009$). Bei einer erhöhten Aluminiumkonzentration im Plasma wird ebenfalls ein verminderter Hämatokrit registriert ($r=-0,406$, $p=6E-4$).

Zusammenhang zwischen der Elementkonzentration und den klinisch-chemischen Parametern Kreatinin und Harnstoff (s. Abb. 2a-g)

Magnesium

Bei einem Anstieg der Kreatininkonzentration läßt sich im Plasma eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration feststellen ($r=0,372$, $p=0,002$). Eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration geht einher mit einer Erhöhung des Magnesiumgehaltes in Vollblut, Plasma und Erythrozyten ($r=0,444$, $p=2E-4$; $r=0,314$, $p=0,007$; $r=0,362$, $p=0,002$), wohingegen der Magnesiumgehalt in den Granulozyten leicht abfällt ($r=-0,218$, $p=0,047$).

Selen

Es besteht nur zwischen der Plasma-Selenkonzentration und der Kreatininkonzentration ein hochsignifikanter Zusammenhang. Beide Parameter verhalten sich gleichsinnig ($r=0,529$, $p=7E-6$). Der Anstieg der Kaliumkonzentration beim akuten Nierenversagen korreliert mit einem Abfall der Selenkonzentration in den Erythrozyten ($r=-0,305$, $p=0,009$).

Abb. 2a-g. Korrelation zwischen gemessenen Elementkonzentrationen und harnpflichtigen Substanzen im Plasma.

Abb 2a. Korrelation zwischen Kreatinin und Magnesium im Plasma.
 $y = 0,265 X + 0,864$
 $r = 0,372$
 $p = 0,002$

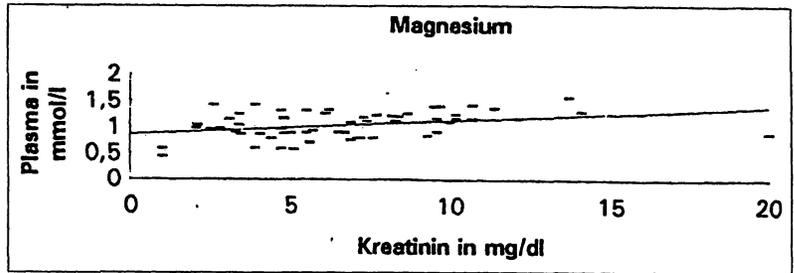


Abb 2b. Korrelation zwischen Harnstoff und Magnesium im Vollblut.
 $y = 0,00263 X + 1,439$
 $r = 0,444$
 $p = 2E-4$

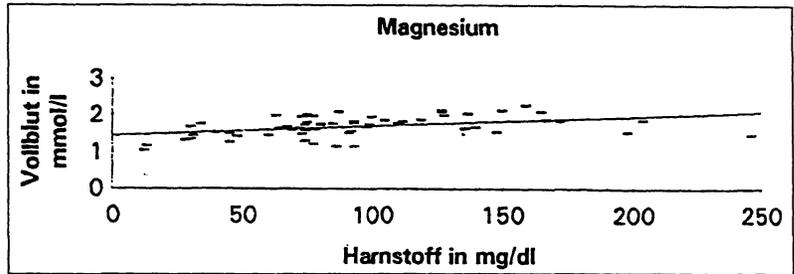


Abb 2c. Korrelation zwischen Kreatinin und Selen im Plasma.
 $y = 0,0263 X + 0,485$
 $r = 0,529$
 $p = 7E-6$

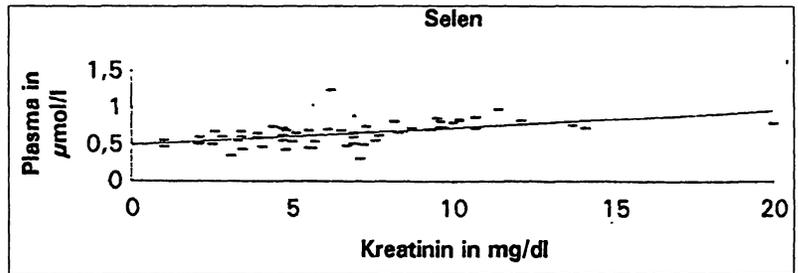


Abb 2d. Korrelation zwischen Harnstoff und Zink im Vollblut.
 $y = 0,1649 X + 63,897$
 $r = 0,560$
 $p = 2E-6$

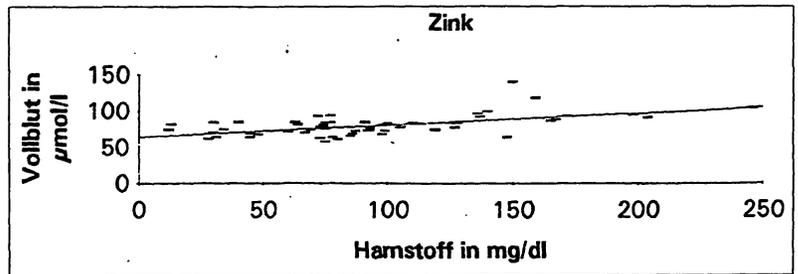
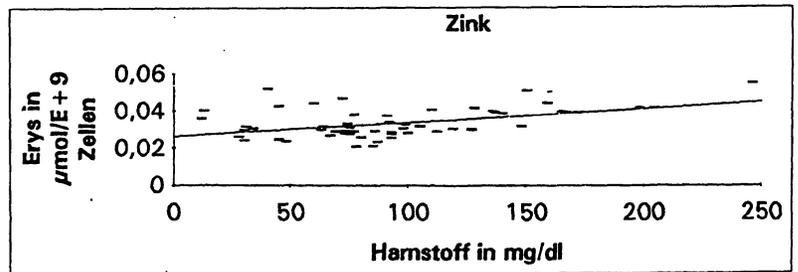


Abb 2e. Korrelation zwischen Harnstoff und Zink in den Erythrozyten.
 $y = 7,71E-5 X + 0,0263$
 $r = 0,474$
 $p = 6E-5$



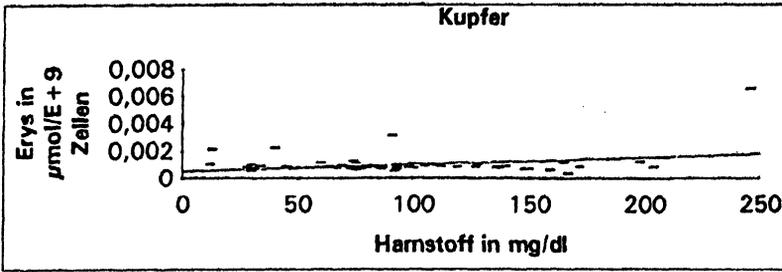


Abb 2f. Korrelation zwischen Harnstoff und Kupfer in den Erythrozyten.

$y = 5,156E-6 X + 0,000517$
 $r = 0,295$
 $p = 0,011$

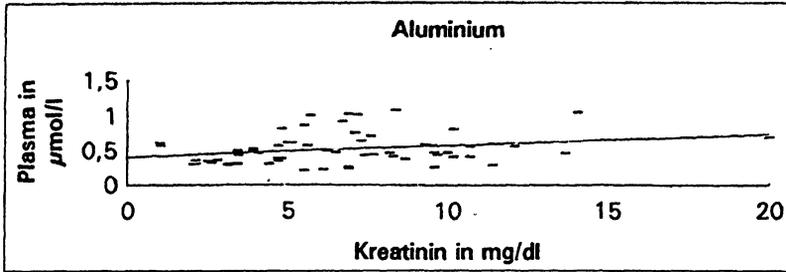


Abb 2g. Korrelation zwischen Kreatinin und Aluminium im Plasma.

$y = 0,0161 X + 0,4085$
 $r = 0,257$
 $p = 0,024$

Zink

In bezug auf die Kreatininkonzentration fällt eine negative Korrelation mit der Zinkkonzentration im Vollblut auf ($r=-0,337$, $p=0,004$). Hingegen verläuft der Anstieg der Harnstoffkonzentration parallel zu einer Anreicherung von Zink im Vollblut und in den Erythrozyten ($r=0,560$, $p=2E-6$; $r=0,474$, $p=6E-5$).

Kupfer

Ein Anstieg der Harnstoffkonzentration geht einher mit einer mäßigen Erhöhung der Kupferkonzentration im Plasma und den Erythrozyten ($r=0,219$, $p=0,047$; $r=0,295$, $p=0,011$).

Aluminium

Ein vermehrter Anfall von Kreatinin im Körper äußert sich in einem Anstieg der Plasmaaluminiumkonzentration ($r=0,257$, $p=0,024$). Die Kaliumretention beim akuten Nierenversagen korreliert mit einem Anstieg des Aluminiumgehaltes im Vollblut ($r=0,293$, $p=0,003$).

Spurenelementkonzentrationen der Kontrollgruppe

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse, getrennt für Männer und Frauen, wiedergegeben.

Tabelle 6. Elementkonzentrationen in den Kontrollgruppen.

Probenmaterial, Einheit	Männliche Probanden Mittelwert	s	Weibliche Probanden Mittelwert	s
<i>Magnesium</i>				
Vollblut, mmol/l	1,614	0,116	1,488	0,124
Plasma, mmol/l	0,91	0,074	0,863	0,053
Thrombozyten, µmol/E+9 Zellen	3,227	1,493	3,514	1,684
Erythrozyten, µmol/E+9 Zellen	0,227	0,028	0,224	0,027
Granulozyten, µmol/E+9 Zellen	5,790	1,911	5,724	2,004
Mononukleäre Zellen, µmol/E+9 Zellen	5,482	1,491	4,012	1,577
<i>Selen</i>				
Vollblut, µmol/l	1,030	0,314	1,154	0,333
Plasma, µmol/l	0,796	0,089	0,824	0,100
Thrombozyten, µmol/E+9 Zellen	0,00978	0,00825	8E-03	8,18E-03
Erythrozyten, µmol/E+9 Zellen	2,84E-04	8,08E-05	2,97E-04	7,67E-05
Granulozyten, µmol/E+9 Zellen	0,140	0,055	0,110	0,044
Mononukleäre Zellen, µmol/E+9 Zellen	0,0640	0,0284	0,056	0,029
<i>Zink</i>				
Vollblut, µmol/l	78,730	8,740	71,430	7,650
Plasma, µmol/l	14,800	2,680	14,900	4,470
Thrombozyten, µmol/E+9 Zellen	0,030	0,002	0,030	0,001
Erythrozyten, µmol/E+9 Zellen	0,0212	0,0142	0,017	0,004

Tabelle 6. Fortsetzung

Probenmaterial, Einheit	Männliche Probanden Mittelwert	s	Weibliche Probanden Mittelwert	s
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,510	0,237	0,328	0,111
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,455	0,283	0,290	0,097
<i>Kupfer</i>				
Vollblut, $\mu\text{mol}/\text{l}$	11,87	2,37	13,380	2,930
Plasma, $\mu\text{mol}/\text{l}$	13,40	2,76	15,340	3,020
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,0021	0,0014	2,86E-03	3,51E-05
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	6,67E-04	4,99E-04	1,48E-03	1,27E-03
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,0182	0,0194	0,013	0,013
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	0,0122	0,0130	0,008	0,007
<i>Aluminium</i>				
Vollblut, $\mu\text{mol}/\text{l}$	0,2127	0,0264	0,209	0,027
Plasma, $\mu\text{mol}/\text{l}$	0,3021	0,312	0,200	0,010
Thrombozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	K.N.	K.N.	K.N.	K.N.
Erythrozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	K.N.	K.N.	K.N.	K.N.
Granulozyten, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	K.N.	K.N.	K.N.	K.N.
Mononukleäre Zellen, $\mu\text{mol}/\text{E}+9$ Zellen	K.N.	K.N.	K.N.	K.N.

Elementkonzentrationen von Patienten- und Kontrollgruppe im Vergleich

Die mittleren Elementkonzentrationen und die $\pm 1s$ -Bereiche sind in den Abb. 3 a-j gezeigt.

Diskussion

Analysenverfahren

Zur analytischen Bestimmung von Mineralstoffen und Spurenelementen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, die sich jedoch in ihrer Spezifität, Empfindlichkeit und Störanfälligkeit stark unterscheiden. Fluorimetrische und colorimetrische Verfahren sind mit einem hohen Arbeitsaufwand und großer Störanfälligkeit durch Kontamination behaftet. Ferner ist ihre Spezifität geringer als bei anderen Verfahren. Die Neutronenaktivierungsanalyse scheidet als Routineverfahren durch den Anschluß an einen Kernreaktor aus. Auch elektrochemische Verfahren erfordern teilweise einen extrem hohen Arbeitsaufwand. Die derzeit am häufigsten angewandte Methode zur Analytik von Spurenelementen ist die Atomabsorp-

tionsspektrometrie (AAS). Die Flammen-AAS weist hierbei die geringste Empfindlichkeit auf, ihre besondere Eignung resultiert daher in der Analyse von Elementen, die in hoher Konzentration in der Probe vorliegen und auch in der Umwelt in beträchtlicher Menge vorhanden sind [2]. Somit kann das Problem der Kontamination durch die Umwelt minimiert werden. Anwendung fand dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit daher bei der Bestimmung von Magnesium. Für die Bestimmung der Spurenelemente Zink, Kupfer und Aluminium kam die flammenlose Graphitrohrföfen-AAS zur Anwendung [3]. Diese zeichnet sich durch hohe Spezifität, eine sehr niedrige Nachweisgrenze und den Vorteil aus, daß der Analyse nur geringe Probenmengen zugeführt werden müssen. Dies ermöglicht überhaupt erst die simultane Bestimmung mehrerer Elemente aus einer Probe, ohne unvertretbar hohe Mengen an Blutproben gewinnen zu müssen. Als Nachteil der Graphitrohrföfen-AAS muß ihre Anfälligkeit für Kontamination angeführt werden, bedingt durch die niedrige Nachweisgrenze. Ein Höchstmaß an Genauigkeit und eine korrekte Arbeitsweise sind damit unabdingbare Voraussetzungen, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen. Zur Selenbestimmung stehen zwei Methoden zur Verfügung. Bei der direkten Selenbestimmung mittels Graphitrohrföfen-AAS treten große Verluste an leichtflüchtigen Selenverbindungen auf [4]. Die Hydrid-AAS stellt bei weitem die genauere Methode dar und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt jedoch in der Abtrennung des zu untersuchenden Elements von Matrixbestandteilen [4]. Durch das Mikrowellenaufschlußverfahren werden ferner für die Analyse schwer zugängliche Selenverbindungen verfügbar gemacht [5].

Wichtig ist bei allen angewandten Analysenverfahren eine regelmäßige Qualitätskontrolle. Durch die fortlaufende Mitführung von Referenz- und Ringversuchsmaterialien sowie laufende Präzisionsmessungen kann eine größtmögliche Sicherheit bei der Probenanalyse erreicht werden.

Optimierung der Probenaufarbeitung

Durch die Abänderung der Zellisolierungsmethode hat sich erst die Möglichkeit eröffnet, nun auch in den Leukozytenfraktionen die Konzentrationen der einzelnen Elemente zu bestimmen. Ursprünglich war eine zu geringe Zellzahl und ein extrem hoher Verunreinigungsgrad mit anderen Zellsorten vorhanden. Ferner zeichneten sich die zu untersuchenden Zellen durch ein hohes Maß an Fragilität bei der Zelltrennung aus mit Zelluntergang und Verklumpung der Zelltrümmer. Durch Abänderung des Isolierungsvorgangs konnte das Ausmaß der Hämolyse, die schon beim ersten Zentrifugationsschritt auftrat, minimiert werden. Mit der Optimierung der Methode ist nun eine Vorgehensweise verfügbar, mit der auch stark vorgeschädigte Zellen mit verminderter Resistenz sauber ge-

Abb. 3 a-j. Gegenüberstellung der Elementkonzentrationen, die bei der Patientengruppe und den Kontrollgruppen gemessen wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. K M, K W: männliche bzw. weibliche Kontrollgruppe; P: Patienten.

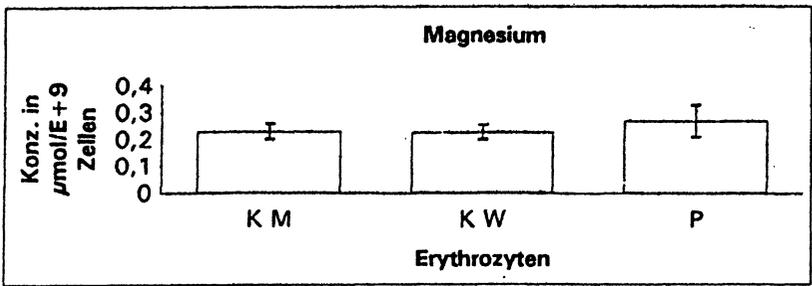


Abb 3a.
Erythrozyten: $p = 2E-4$

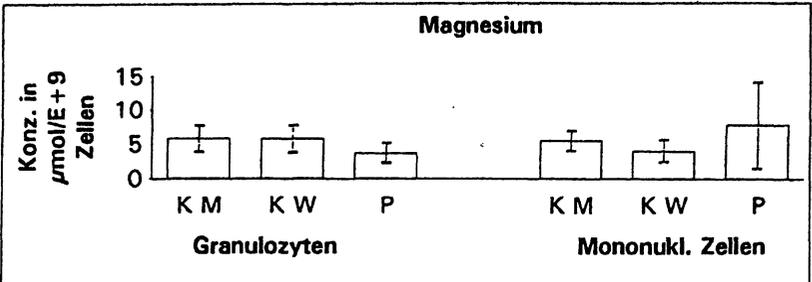


Abb 3b.
Granulozyten: $p = 4E-7$
Mononukl. Zellen: $p = 0,017$

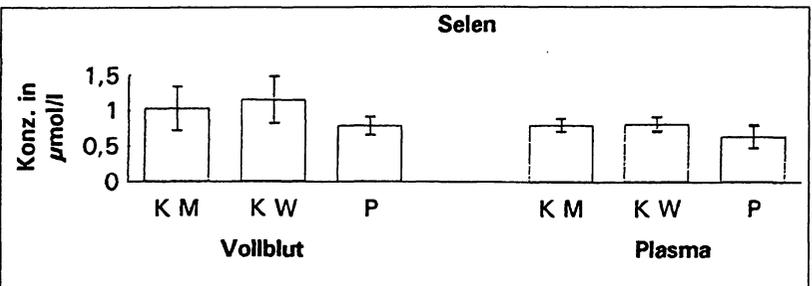


Abb 3c.
Vollblut: $p = 1E-6$
Plasma: $p = 5E-8$

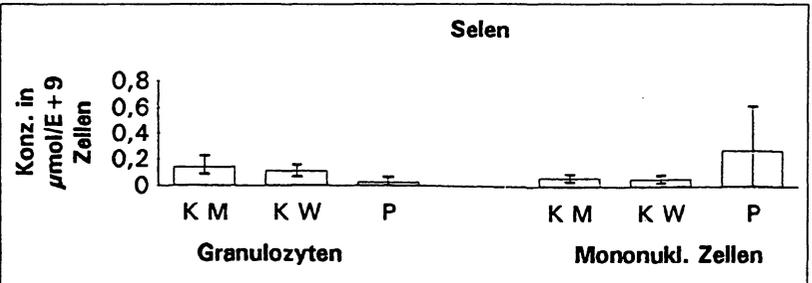


Abb 3d.
Granulozyten: $p = 6E-14$
Mononukl. Zellen: $p = 3E-5$

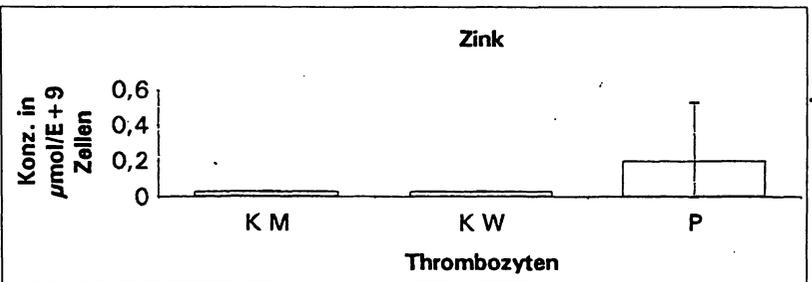


Abb 3e.
Thrombozyten: $p = 3E-8$

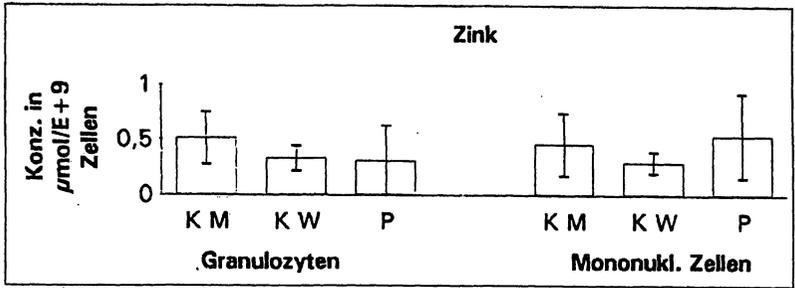


Abb 3f.
Granulozyten: $p = 4\text{E}-5$
Mononukl. Zellen: $p > 0,05$

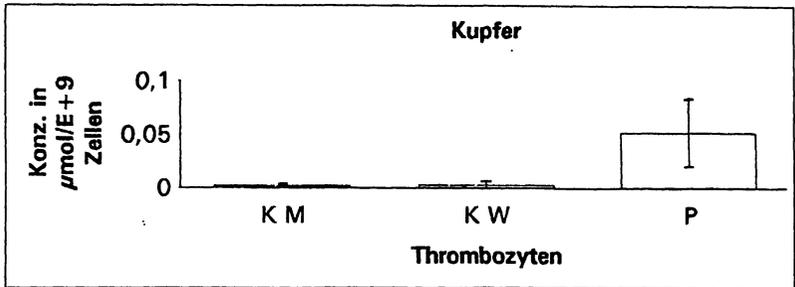


Abb 3g.
Thrombozyten: $p = 1\text{E}-15$

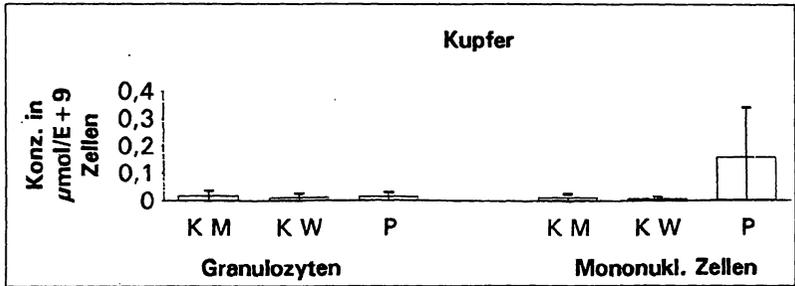


Abb 3h.
Granulozyten: keine Signifikanz
Mononukl. Zellen: $p = 2\text{E}-14$

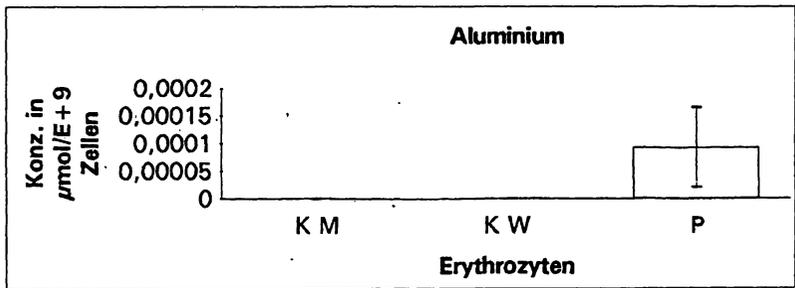


Abb 3i.
Erythrozyten: $p \infty 0$

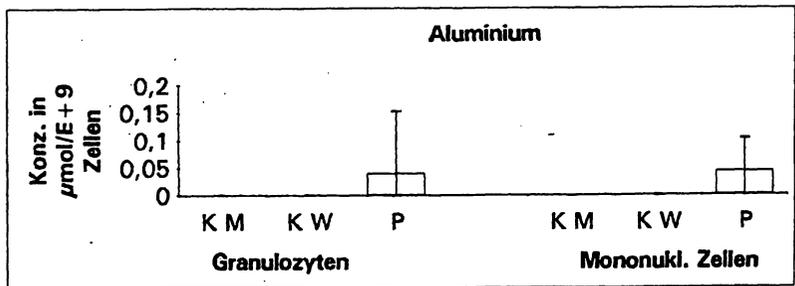


Abb 3j.
Granulozyten: $p \infty 0$
Mononukl. Zellen: $p \infty 0$

trennt werden können. Das Problem der Verunreinigung der Leukozytenfraktionen, insbesondere der mononukleären Zellen, ist nun beherrschbar.

Durch die Aufarbeitung der Erythrozyten in einem separaten Vorgang können diese der direkten Messung zugänglich gemacht werden. Dadurch verringert sich die Anzahl derjenigen Parameter, von denen das Endergebnis abhängt, stark. Bei der indirekten Bestimmung der Erythrozyten hängt das Ergebnis von fünf Parametern ab, bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode nur von zwei.

Durch die Verdauung der Proben vor der Analyse mit Proteinase K und SDS werden auch im Zellinnern gebundene Elemente der Analyse leichter zugänglich. Ferner wird eine Homogenisierung der Probe erreicht.

Präanalytische Einfluß- und Störfaktoren

Sowohl die Vorbereitung der Probanden als auch die eigentliche Materialgewinnung, die Lagerung und Behandlung der Proben bedürfen vor Beginn jeder Arbeit der sorgsamsten Überprüfung. Es kann hier zu erheblichen Verlusten an Material kommen, wie auch zu Verunreinigungen durch verwendete Reagenzien, Geräte und die Umwelt [6]. Daraus folgt, daß nicht unbedingt die Empfindlichkeit einer Methode der limitierende Faktor ist, sondern die Konzentration des zu bestimmenden Elements in der Probe im Verhältnis zu seiner Konzentration in der Umwelt. Bei den präanalytischen Einflußfaktoren ist zunächst an solche zu denken, die von den Probanden selbst ausgehen, wie beispielsweise Gesundheitszustand, Medikamenteneinnahme oder hormonelle Einflüsse, weiterhin Alter, Rasse und Geschlecht [7]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Behandlung der Probenentnahmestelle mit Desinfektionsmitteln, die Materialien zur Probengewinnung und die Aufbewahrung der Proben. Durch Adsorption des zu untersuchenden Materials an Probengefäße kann es beispielsweise zum Verlust an Spurenelementen kommen, gleichzeitig können jedoch auch Ionen aus Materialien freigesetzt werden [8]. Eine sekundäre Verunreinigung der Proben mit freierwährenden Spurenelementen durch Hämolyse kann durch ein sofortiges Auftrennen der Probe verhindert werden. Bei der Herstellung der Referenz- und Bezugslösungen ist auf ein peinlich genaues Pipettieren zu achten. Ferner hat die Probenverdünnung eine entscheidende Auswirkung auf das Meßergebnis, da die Empfindlichkeit der Meßmethode nur im linearen Bereich der entsprechenden Bezugsfunktion von der Masse, beziehungsweise der Konzentration, des zu untersuchenden Elements abhängt [9].

Probenmaterial

Das zu untersuchende Material muß grundsätzlich zwei Bedingungen erfüllen: Zum einen muß es für das zu erörternde Krankheitsbild relevant sein, zum anderen muß

die Analyse des Elements durchführbar und ethisch vertretbar sein. Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Elemente erklärt sich aus deren wichtiger Funktion im menschlichen Organismus, beziehungsweise aus deren schädlichem Einfluß auf wichtige Stoffwechselabläufe im menschlichen Körper. Ferner wurden bereits bei zahlreichen Erkrankungen Veränderungen im Haushalt dieser Elemente registriert. Darüber hinaus ist die Analyse dieser Elemente auf eine Weise möglich, die es gestattet für die Ergebnisse ein hohes Maß an Genauigkeit und Richtigkeit zu garantieren.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Auswahl der Matrix, in der die zu bestimmende Substanz gemessen werden soll. Immer wieder ist man dabei auf die Analyse von Blutzellen zurückgekommen [10]. Jedoch wurde in den meisten Fällen die Konzentration in nur einer Matrix bestimmt und großzügig auf den Versorgungsstatus des ganzen Körpers geschlossen. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Analyse aller Elemente in sechs Kompartimenten parallel vorgenommen. Die peripheren Blutzellen entstammen größtenteils dem Knochenmark, das zu den stoffwechselaktivsten Organen zählt. Durch die unterschiedliche Halbwertszeit der einzelnen Zellen kann ferner zwischen akuten und chronischen Verläufen unterschieden werden. Zudem übt das Blut eine Vermittlerfunktion zwischen den Kompartimenten aus. Im Gegensatz zu den Speicherorganen, in denen sich oft bei akuten Ereignissen erst mit starker Verzögerung Konzentrationsunterschiede bemerkbar machen, können Umverteilungsvorgänge anhand der peripheren Blutzellen früher erkannt werden.

Magnesium

Im Vergleich zu den Magnesiumkonzentrationen der verschiedenen Kompartimente der Kontrollgruppe fällt bei den Patienten mit akutem Nierenversagen außer in den Granulozyten eine signifikant höhere Konzentration dieses Elements auf. Im Vollblut und im Plasma lassen sich durch die signifikanten Korrelationen der jeweiligen Magnesiumkonzentrationen und der Parameter Kreatinin und Harnstoff eindeutige Bezüge zur eingeschränkten Nierenfunktion herstellen. Ursachen hierfür werden in Transmineralisationsvorgängen und dem Ausscheidungsdefizit gesehen [11]. Die bestehende Azidose und der Proteinkatabolismus tragen ebenfalls ihren Anteil zur Konzentrationsverschiebung zwischen den Kompartimenten bei, zum einen durch eine Änderung der Anzahl der verfügbaren intrazellulären Bindungsstellen für Magnesium, zum anderen durch Magnesiumfreisetzung aus Proteinen. Auch die bei dem untersuchten Krankheitsbild vermehrt ausgeschütteten Katecholamine führen zu einer intrazellulären Anreicherung von Magnesium [12]. Ein weiterer wesentlicher Punkt stellt die bei den Patienten auftretende Hämolyse dar, wodurch große Mengen intrazellulär gebundenen Magnesiums frei werden. Mög-

liche Auswirkungen einer erhöhten intra- und extrazellulären Magnesiumkonzentration sind die Hemmung von ATP-asen und der Glykolyse [13]. Teilweise kann die Hemmung der Enzyme über die Bildung von inaktiven Aktivator-Enzym-Aktivator-Komplexen erklärt werden. Weiterhin kann es durch ein Übermaß an Magnesiumionen zur Blockade von Ionenkanälen in der Zellmembran kommen, was zur Störung wichtiger elektrophysiologischer Vorgänge führt [11]. Auch die Zellfluidität wird negativ beeinflusst. Dies kann zu einer verminderten Verformbarkeit der Erythrozyten führen. Magnesium kann in erhöhter Konzentration weiterhin zu einer Störung der Blutgerinnung führen. Als weitere Punkte müssen die verminderte Bereitstellung von intrazellulärem Calcium sowie die Sekretionshemmung von Immunglobulinen genannt werden [14, 15]. Möglicherweise kann durch den letzten Punkt zum Teil das Immundefizit der Patienten erklärt werden.

Als geeignete Parameter zur Festlegung des Magnesiumstatus eignen sich die Erythrozyten und die mononukleären Zellen.

Selen

Bei den Patienten mit akutem Nierenversagen fällt im Vergleich mit den gesunden Personen der Kontrollgruppe eine verminderte Selenkonzentration im Vollblut, dem Plasma, den Erythrozyten und den Granulozyten auf. Demgegenüber ist in den mononukleären Zellen eine signifikant höhere Selenkonzentration im Patientenkollektiv zu verzeichnen. Man kann also bezüglich der Konzentrationen in Vollblut, Plasma, den Granulozyten und den Erythrozyten von einem Selendefizit der Patienten zur Zeit der Untersuchung sprechen. Interessanterweise besteht jedoch zwischen der Einschränkung der Nierenfunktion, gemessen am Anstieg der Kreatininkonzentration, und der Selenkonzentration im Plasma ein statistisch gesicherter positiver Zusammenhang ($r=0,529$; $p=7E-6$). Die Selenkonzentration nimmt also ausgehend von einem noch niedrigeren Wert vor Beginn der Erkrankung im Laufe des akuten Nierenversagens zu. Mögliche Ursachen für eine Anreicherung von Selen im Organismus werden in der Einschränkung der Nierenfunktion, dem Hauptausscheidungsorgan für Selen, und im Muskelabbau bei katabolem Stoffwechsel gesehen [16]. Eine überschießende Anreicherung mit dem Spurenelement Selen bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten wird wahrscheinlich verhindert durch das Auffüllen eventuell ungenügend versorgter Selenreserven und dem raschen Einbau in erythrozytäre Vorstufen [17]. Es werden mannigfaltige Auswirkungen beschrieben, die durch ein Ungleichgewicht im Selenhaushalt verursacht werden. Viele dieser Veränderungen können in direkten Zusammenhang zum Krankheitsgeschehen des akuten Nierenversagens gebracht werden. So kann es durch einen Mangel an Selen durch Störung der Prostaglandinsynthese zu einer negativen Auswirkung auf die glomeruläre Filtrationsrate kom-

men [18]. Ferner bewirkt eine durch Selenmangel verminderte Glutathionperoxidaseaktivität, bedingt durch Störung des Pentosephosphatwegs, eine erhöhte Schädigung ischämischer Gewebe [19, 20]. Insbesondere in der Phase der postischämischen Radikalfreisetzung kann es zu einer mangelnden Antagonisierung kommen mit weiterer Schädigung des Nierengewebes [20]. Auch an vielen anderen zellulären Membransystemen im Organismus sind Schädigungen bei Selenmangel beschrieben worden [21]. Das bei den Patienten mit akutem Nierenversagen anzutreffende Immundefizit kann zum Teil auch in Zusammenhang mit dem gestörten Selenhaushalt gebracht werden. So werden wichtige Prozesse wie Chemotaxis, Migration und die Ausprägung der Interleukin-2-Rezeptorantwort auf stimulierten Lymphozyten von Selen beeinflusst. Zu beachten ist dabei jedoch, daß sowohl ein Selenmangel als auch ein Übermaß des Elements dieselben immunologischen Prozesse hemmt, in deren Funktion Selen bei normaler Konzentration fördernd eingreift [22].

Als Parameter zur Festlegung des Selenstatus haben sich die Granulozyten und die mononukleären Zellen bewährt. Die erniedrigte Selenkonzentration in den Granulozyten spiegelt den vor Beginn der Krankheit bestehenden Selenmangel wieder, die Konzentration in den mononukleären Zellen die Retention von Selen mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion.

Zink

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wird bei Patienten mit akutem Nierenversagen eine erhöhte Zinkkonzentration in den kernlosen Thrombozyten und Erythrozyten festgestellt. Begünstigend hierfür wirkt sich die bestehende Azidose aus, die zu einer intrazellulären Anreicherung von Zink führt [23]. Durch vermehrte Hämolyse und Katabolismus mit Zellabbau kommt es im Rahmen des Krankheitsbildes zu einem Freiwerden großer Zinkmengen [24]. Schon eine Hämolyse von nur 1 % führt zu einer Erhöhung der Zinkplasmakonzentration um 15 % [25]. Bei katabolen Stoffwechselluständen wird ferner über eine vermehrte Exkretionsrate von Zink über die Nieren berichtet [24]. Durch die sinkende Exkretion über den Darm bei den großteils parenteral ernährten Patienten wird dieser Aspekt noch verstärkt. Auch bei anderen Krankheitsbildern, die mit einer Ausschüttung von Katecholaminen einhergehen, kommt es zu einer Anreicherung von Zink im Plasma und zur Umverteilung zwischen den einzelnen Kompartimenten [26]. Der durch Selenmangel gestörte Prostaglandinstoffwechsel wirkt sich zusätzlich negativ aus im Sinne einer intrazellulären Anreicherung von Zink durch Hemmung der Prostaglandin E₁-Synthese. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß die Niere zu den am meisten durch Zink geschädigten Organen zählt [27, 28]. Weiterhin kommt es zu verstärkter Hämolyse mit konsekutiv weiterem Anstieg der Zinkplasmakonzentration. Als wichtiger Aspekt in der Pathogenese des akuten Nierenversagens muß gel-

ten, daß die Sauerstoffabgabe der Erythrozyten durch eine intrazellulär erhöhte Zinkkonzentration stark erschwert wird [29, 30]. Daß dies negative Auswirkungen auf die ischämisch geschädigten Zellgebiete der Nieren hat, versteht sich von selbst. Weiterhin wird eine Großzahl wichtiger Enzyme durch eine erhöhte Zinkkonzentration gehemmt. Es kommt durch Beeinträchtigung der Glykolyse, wichtiger ATP-asen und der Cytochromoxidase zu einer Einschränkung der Energiebereitstellung im Organismus [31].

Als Parameter zur Erfassung des Zinkstatus eignen sich besonders die kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten.

Kupfer

Als wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit muß der Nachweis einer Kupferbelastung der Patienten mit akutem Nierenversagen gewertet werden. Aufgrund der Tatsache, daß in den meisten Studien nur die Kupferkonzentration in Vollblut und Plasma untersucht wurde, welche sich auch in dieser Arbeit kaum ändert, wurde die Akkumulation des Spurenelements Kupfer im Organismus dieser Patienten bisher nicht erkannt. Obwohl der Hauptteil der Kupferexkretion biliär verläuft, wird in allen zellulären Bestandteilen des Blutes außer in den Granulozyten eine starke Anreicherung dieses Elements beobachtet. Eine mögliche Ursache der Kupferanreicherung dieser Patienten kann die verminderte Exkretion von Kupfer über die Galle bei Glutathionmangel sein. Weiterhin stehen bei akuten Ereignissen vermehrt Bindungsstellen für Kupfer in Form von Coeruloplasmin als Akute-Phase-Protein zur Verfügung [32]. Durch die verstärkte parenterale Aminosäurezufuhr kann es zusätzlich zu einer Retention von aminosäuregebundenen Kupferionen kommen, da gerade dieser Teil der Kupferexkretion über die Nieren abläuft. Bei parenteraler Ernährung und Flüssigkeitsrestriktion kommt es ferner zu einer verminderten Galleproduktion. Durch die rasche Austauschrate von Kupfer ist es wahrscheinlich bedingt, daß sich die Akkumulation dieses Elements im Plasma nicht niederschlägt [33]. Bekanntermaßen üben Kupferionen in erhöhter Konzentration einen nephrotoxischen Effekt aus [34, 35]. Auch an anderen Zellmembranen kommt es jedoch zur Instabilität mit anschließendem Zelluntergang [36]. Die Erythrozyten verlieren ihre Verformbarkeit und unterliegen einem verstärkten Zellabbau im retikulo-endothelialen System [37]. Gleichzeitig wird die Membran der Erythrozyten durch vermehrte Lipidperoxidation geschädigt [38]. Insgesamt kommt es dadurch zu einer Verstärkung der Hämolyse. Weiterhin werden wichtige Enzyme wie die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase gehemmt und es kommt zu einer zusätzlichen Hemmung der Glutathionproduktion durch Kupferionen [39]. Über einen Rückgang der Lymphozytenproliferation kann die verstärkte Anfälligkeit der Patienten für Infektionen mitbegründet sein [40].

Besonders die mononukleären Zellen eignen sich für die Festlegung des Kupferstatus.

Aluminium

Aluminium reichert sich bei Patienten mit akutem Nierenversagen in allen untersuchten Kompartimenten in unterschiedlichem Ausmaß an. Auch in den zellulären Blutbestandteilen kann Aluminium im Unterschied zu den Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Eine Anreicherung dieses Elements bei den hier untersuchten Patienten kann eindeutig in Bezug zur eingeschränkten Nierenfunktion gebracht werden [41]. Auch Nahrungsmittel und Infusionslösungen können zu einer Belastung der Patienten mit diesem Element führen [42]. Aufgrund der hohen Plasmaeiweißbindung von etwa 95 % ist Aluminium schlecht dialysabel. Auswirkungen auf den Organismus hat Aluminium bei akuter Anreicherung vor allem auf die Erythrozyten. So kommt es zu einer verkürzten Erythrozytenüberlebenszeit, zur Erythropoetinresistenz und zur Hämolyse mit konsekutiver Anämie [43, 44]. Intraerythrozytär werden wichtige Enzyme der Glykolyse gehemmt [45]. Weitere durch Aluminium geschädigte Zellen sind Lymphozyten und Makrophagen [46]. Ein Teil der Schädigung kann durch Eisenfreisetzung und vermehrte Radikalbildung erklärt werden [21]. Durch Hemmung der Superoxiddismutase resultiert eine verminderte Abwehr gegenüber Zellschädigungen [45]. Aufgrund der geringen Vorbelastung der Patienten kann eine rasche Aufnahme von Aluminium in verschiedenen Geweben angenommen werden.

Vor allem die Fraktion der Leukozyten mit ihren beiden Untergruppen den Granulozyten und den mononukleären Zellen erlaubt eine gute Beurteilung der Aluminiumbelastung des Organismus.

Schlußbemerkung

Insgesamt gesehen ist in der vorliegenden Arbeit deutlich geworden, wie wichtig die parallele Untersuchung verschiedener Kompartimente für die exakte Erfassung der Konzentration von Mineralstoffen und Spurenelementen ist. Von der alleinigen Betrachtung der jeweiligen Konzentrationen in Vollblut und Plasma muß dringend abgeraten werden. Es hat sich in den vorliegenden Studien gezeigt, daß die peripheren Blutzellen sehr gut geeignet sind, Verschiebungen der physiologischen Konzentrationen genau wiederzugeben. Auch geringe Schwankungen der Elementkonzentration werden erfaßt. Durch die Erarbeitung einer Trennmethode ist es nun möglich, Zellfraktionen von großer Reinheit und genügender Zellzahl zur Verfügung zu haben. Bei der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Elementkonzentration und Prozessen beim Krankheitsbild des akuten Nierenversagens sind wichtige Aspekte und Bezüge aufgedeckt

worden. Genau dokumentierte Konzentrationsangaben wichtiger Elemente in verschiedenen Kompartimenten über den Zeitraum von einer Woche bei akutem renalem Ausscheidungsdefizit stehen zur Verfügung. Des Weiteren liegen Referenzwerte vor, die mit derselben Methode erstellt wurden und für den Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien herangezogen werden können.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. D. Kruse-Jarres danke ich herzlich für die qualifizierte und angenehme Betreuung bei der Durchführung der Studien. Herrn Prof. Dr. Schneider (ehemals Katharinenhospital Stuttgart) danke ich dafür, mir den Zutritt zu Patienten in verschiedenen Kliniken im Großraum Stuttgart und Tübingen verschafft zu haben. Für die Auszeichnung meiner Dissertationsarbeit mit dem Förderpreis der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin möchte ich mich bei Herrn Prof. L. Thomas, Frankfurt, und den übrigen Mitgliedern der Jury von Herzen bedanken. Mein Dank gilt selbstverständlich auch allen Patienten und Kontrollprobanden, ohne deren Einverständnis die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen wäre.

Literatur

- IFCC Committee on Standards (1980) *J Clin Chem Clin Biochem* 18, 78–88
- Bertram HP (1992) Zur Analytik von Spurenelementen. In: Fortschritt und Fortbildung in der Medizin Band 16. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, pp 131–137
- Paschen K (1979) Methode zur Bestimmung von Zink im Serum mittels Atomabsorptions-Spektrometrie. In: Kruse-Jarres JD (ed) Zinkstoffwechsel: Bedeutung für Klinik und Praxis. Verhandlungsbericht Internationales Symposium Oktober 1978 Freiburg-Breisgau TM-Verlag Bad Oeynhausen pp 69–73
- 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
- Welz B, Melcher M, Schlemmer G (1984) Accuracy of the selenium determination in human body fluids using atomic absorption spectrometry. *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology* 3, 207–215
- Schmitt Y (1988) Präanalytische Voraussetzungen bei der Bestimmung von Spurenelementen in biologischen Materialien. *Ärztl Lab* 34, 233–238
- Rösick U, Recknagel S, Brätter P (1991) Probleme der Aluminiumbestimmung im Serum. In: Brätter P, Gramm H (eds) Mineralstoffe und Spurenelemente in der Ernährung der Menschen. Blackwell Wissenschaft Berlin, pp 104–117
- Hall M, Loscombe S, Taylor A (1988) Trace element contamination from blood specimen containers. *Trace Elements in Medicine* 5 (3), 126–129
- Schlemmer G, Baasner J, Lehmann R (1989) Empfindlichkeit, Nachweisgrenzen und Arbeitsbereich in der Atomabsorptionsspektrometrie. In: Welz B (ed) 5. Kolloquium Atomabsorptionsspektrometrie. Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH
- Iyengar GV, Kollmer WE (1986) Some aspects of sample procurement from human subjects for biomedical trace element research. *Trace Elements in Medicine* 3 (1), 25–33
- Hänze S (1962) *Der Magnesiumstoffwechsel: Physiologie und Klinik*. Hippokrates Verlag Stuttgart
- Ryzen E, Servis K, Rude R (1990) Effect of intravenous epinephrine on serum magnesium and free intracellular red blood cell magnesium concentration measured by nuclear magnetic resonance. *J Am Coll Nutr* 9 (2), 114–119
- Gibson RS (1989) Assessment of trace element status in humans. *Progr Food Nutr Sci* 13 (2), 67–111
- Wacker W (1980) *Magnesium and man*. Harvard University Press, Great Britain.
- Zhang A, Cheng T, Altura B (1992) Extracellular magnesium regulates intracellular free magnesium in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 421, 391–393
- Oster O, Prellwitz W (1990) The renal excretion of selenium. *Biological Trace Element Research* 24 (2), 119–146
- Veillon C, Patterson K, Button L, Sytkowski A (1990) Selenium utilisation in humans: A long-term, self labeling experiment with stable isotopes. *Am J Clin Nutr* 52, 155–158
- Guidi GC, Bellisola G, Bonadonna G, Manzato F, Ruzzenente O, Schiavon R, Galassini S, Liu QX, Shao H, Moschini G (1990) Selenium supplementation increases renal glomerular filtration rate. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 4(3), 157–161
- Korb SM, Alborno G, Light JA (1990) Selenium addition to the flush/preservation solution protects kidneys against oxidative stress during warm and cold ischemia. *Transplantation Proceedings* Vol. 22 (2), 452–454
- Shan X, Aw TY, Jones DP (1990) Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 47, 61–71
- Joshi JG (1990) Aluminium, a neurotoxin which affects diverse metabolic reactions. *BioFactors* Vol. 2 (3), 163–169
- Nève J (1991) Reviews: Physiological and nutritional importance of selenium. *Experientia* 47, 187–193
- Kalfakakou V, Simons T (1990) Anionic mechanisms of zinc uptake across the human red cell membrane. *J Physiol (Lond)* 421, 485–497
- Kruse-Jarres JD (1988) Ursachen und Auswirkungen des Zinkmangels. *Ärztl Lab* 34, 249–256
- Dörner K, Kaltwasser JP, Ziegler R (1988) Eisenstoffwechsel, Spurenelemente und toxische Metalle; Thomas L, Walb D (1988) Niere und ableitende Harnwege. In: Labor und Diagnose, 3. Aufl. (Thomas L ed) Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, Germany.
- Lindemann RD, Mills B (1980) Zinc homeostasis in health and disease. *Miner Electrolyte Metab* 3, 223–236
- Abdel-Mageed AB, Oehme FW (1990) A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron I: zinc. *Vet Hum Toxicol* 32, 34–39
- Jackson MJ (1989) Physiology of zinc: General aspects. In: Mills CF (ed) *Human Nutrition Reviews: Zinc in human biology*. Springer Verlag Heidelberg, pp 1–31

29. Hider R, Ejim L, Taylor P, Gale R, Huehns E, Porter J (1990) Facilitated uptake of zinc into human erythrocytes. Relevance to the treatment of sickle-cell-anemia. *Biochem Pharmacol* 39 (6), 1005–1012
30. Spieker C. (1992) Die Bedeutung von Zink und Cadmium in der Medizin. In: Fortschritt und Fortbildung in der Medizin, Band 16, Deutscher Ärzte-Verlag Köln, pp 139–145
31. Krotkiewska B, Banas T (1992) Interaction of zinc and copper ions with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from bovine heart and rabbit muscle. *Int J Biochem* 24 (9), 1501–1505
32. Houwen R, Dijkstra M, Kuipers F, Smit E, Havinga R, Vonk R (1990) Two pathways for biliary copper excretion in the rat. The role of glutathione. *Biochem Pharmacol* 39 (6), 1039–1044
33. Dunn MA, Green MH, Leach RM (1991) Kinetics of copper metabolism in rats: a compartmental model. *Am J Physiol* 261 (1 Pt 1), E115–125
34. Dash S (1989) Copper sulphate poisoning and acute renal failure. *Int J Artif Organs* 12, 610
36. Saris N, Skulskii I (1991) Interactions of copper with mitochondria. *Acta Chem Scand* 45 (10), 1042–1046
37. Gwozdinski K (1991) A spin label study of the action of cupric and mercuric ions on human red blood cells. *Toxicology* 65(3), 315–323
38. Fernandez AC, Filipe P, Manso C. (1992) Protective effects of a 21-aminosteroid against copper-induced erythrocyte and plasma lipid peroxidation. *Eur J Pharmacol* 220 (2–3), 211–216
38. Hosocski E, Sunderic D, Sindjic M (1990) Functional and histologic changes in the kidney in copper poisoning in rats. *Srp Arh Celok Lek* 118 (11–12), 445–449
39. Kumar A, Sharma CB (1987) Hematological indices in copper-poisoned rats. *Toxicol Lett* 38 (3), 257–258
40. Kucharz E, Sierakowski S (1988) Effect of copper on activation of human T cells. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 32 (2), 147–152
41. Davenport A, Roberts N (1989) Accumulation of aluminium in patients with acute renal failure. *Nephron* 52, 253–258
42. Koppel C, Baudisch H (1988) Inadvertent metal loading of critically ill patients with acute renal failure by human albumin solution infusion therapy. *J Toxicol Clin Toxicol* 26 (5–6), 337–356
43. Druke T (1990) Resistance to recombinant human erythropoietin in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 10 Suppl 2, 34–39
44. Zatta PF, Nicolini M, Corain B (1992) Aluminium in experimental cell pathology. In: Aluminium in biology and medicine, Ciba Foundation Symposium 169. J. Wiley, New York, pp 186–200
45. Shainkin-Kestenbaum R, Caruso C, Berlyne GM (1990) Reduced dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients: a possible factor in the etiology of uremic anemia. *Nephron* 55 (3), 251–253
46. Kerr D, Ward M, Hewett A, Simpsont W, Parkonson I (1992) Aluminium intoxication in renal disease. In: Aluminium in biology and medicine, Ciba Foundation Symposium 169, J. Wiley New York, pp 123–133