

Etapa I

Oligoelemente - elemente care, în cantități foarte mici, pot avea un rol fiziologic important în organismele vii. Acestea sunt: Cr, Mn, Cu, Zn, Cd, Pb, Mo, Se, Co, etc.

În perioadele de stres organismul consumă mai repede oligoelementele și dacă acestea sunt înlocuite, sistemul nervos își pierde progresiv resursele și se instalează starea de anxietate.

Includerea vitaminelor în special (din complexul B) și a oligoelementelor constituie o alternativă în susținerea sistemului nervos.

În zilele noastre, aproape toată lumea este conștientă de importanța pe care o au vitaminele în alimentație. Foarte puțini oameni știu că în lipsa substanțelor minerale și a oligoelementelor, vitaminele nu își pot exercita efectul benefic.

În lipsa cromului, metabolismul glucidic nu este eficient. Cobaltul asemenea fierului, este indispensabil în procesul de formare a globulelor roșii. Fără cupru, fierul nu poate fi înglobat în hemoglobină. Manganul susține activitatea corespunzătoare a unor enzime gastrice și de asemenea, are importanță în eliminarea toxinelor. Molibdenul își aduce aportul în metabolismul glucidic și lipidic și în același timp este un component important al enzimei care asigură utilizarea fierului. Seleniul la fel ca vitamina E, este un antioxidant important și încetinește îmbătrânirea țesuturilor, având rol în prevenirea formării tumorilor maligne. Zincul controlează și dirijează procesele metabolice, activitatea enzimelor, menține integritatea celulelor și este indispensabil pentru sinteza proteinelor.

Ultimele cercetări au dovedit că zincul are rol și în desfășurarea normală a funcțiilor cerebrale și poate fi utilizat ca adjuvant în tratamentul unor boli psihice (schizofrenie).

Plumbul și cadmiu din atmosfera orașelor mari, provenite din gazele de eșapament ale mașinilor, precum și fumul de țigară constituie factori de risc pentru sănătatea populației.

Carența de zinc determină reținerea unei cantități mai mari de plumb și cadmiu în organism, iar administrarea de suplimente alimentare cu zinc reduce fixarea acestor elemente toxice în organism. Așadar, zincul poate oferi o anumită protecție și împotriva efectelor nocive ale mediului poluant. Alimentele bogate în zinc sunt: grâul, drojdia de bere, semințele de dovleac, laptele degresat și muștarul

Dacă oligoelementele lipsesc, vitaminele nu mai pot fi asimilate și nu-și mai exercită efectul. Importanța acestor oligoelemente este subliniată și de faptul că, în timp ce organismul este capabil să sintetizeze anumite vitamine, aceste oligoelemente trebuie aduse prin aport alimentar.

Trebuie menționat că deși frecvent utilizate în practica, funcția specifică exercitată de multe elemente, structurile în care se integrează, sunt numai parțial cunoscute sau necunoscute. Practica medicală a confirmat că multe maladii și tulburări metabolice se datoresc lipsei sau unui exces al unor compuși metalici sau nemetalici. Concentrația microelementelor în sângele uman, corelată cu alți parametri este utilă în scop de diagnostic și tratament. Astfel cuprul care se găsește în multe alimente

(crustacee, pești, ficat, rinichi, creier, nuci, legume uscate, fructe și cacao) poate fi asociat atunci când este în exces sau în deficit cu o serie de maladii. Creșterea nivelului cuprului este asociat cu schizofrenia, tulburări de învățare, senilitate. Depresia și alte probleme mentale sindromul premenstrual și hiperreactivitatea au fost corelate cu nivelul crescut al cuprului, de cele mai multe ori asociat cu un nivel scăzut de zinc. Anumite studii legate de schizofrenie au subliniat prezența unui nivel crescut al cuprului în sânge și a unui nivel de zinc în sânge scăzut. În unele din aceste cazuri, zincul a fost util ca agent anti-anxios. Anomaliile în metabolismul cuprului și fierului au rol în patogeneza anumitor boli neurodegenerative. Cromul, mercurul sunt alte oligominerale implicate în etiopatogenia schizofreniei.

Dacă oligoelementele lipsesc, vitaminele nu mai pot fi asimilate și nu-și mai exercită efectul.

Importanța acestor oligoelemente este subliniată și de faptul că, în timp ce organismul este capabil să sintetizeze anumite vitamine, aceste oligoelemente trebuie aduse prin aport alimentar.

Știința nutriției începe să-și spună cuvântul în bolile psihice. Nu mai reprezintă o noutate faptul că „dieta pune în valoare marele său potențial de vindecare în bolile psihice”. O dieta în

care predomină legumele, fructele, carnea albă este considerată un mijloc incontestabil de împiedicare a oxidării celulelor creierului de către radicalii toxici ai oxigenului, prezenți și în schizofrenie. Suplimentarea cu vitamina E, betacaroten, vitamine din complexul B, B12, B6, vitamina C acid folic, melatonina, niacina, acizi grași omega-3, este benefică în tratamentul acestei boli.

Testarea pacienților pentru depistarea deficitelor, exceselor și dezechilibrelor minerale devine din ce în ce mai importantă, datorită cantității mari de metale toxice din mediul înconjurător și dezechilibrelor minerale larg întâlnite la omul modern, secundar dietei necorespunzătoare și prezenței unor îmbolnăviri. Analiza minerală din probe biologice în țesuturi reprezintă o metodă eficientă și fidelă pentru determinarea expunerii pe termen lung la minerale toxice și a deficitelor de substanțe nutritive. Utilizând analiza minerală din probe biologice, clinicianul poate depista și în consecință trata dezechilibrele minerale și intoxicațiile care de cele mai multe ori se manifestă mascat, sub forma sindromului oboselii cronice, depresiei, hiperactivității (la copii), tulburărilor de comportament, încetirii proceselor de idee, răspunsului alterat la stres, afecțiunilor psihiatrice, cardiovasculare, neurologice, tiroidiene și altele. Practicienii au găsit metoda deosebit de utilă în cazurile în care etiologia bolii nu era depistată sau în cazurile în care existau mai multe cauze sinergice pentru afecțiunea respectivă.

Metode de determinare a oligoelementelor

Determinările din probe clinice: Analiza urinei; Analiza sângelui; Analiza firului de păr

Metoda SAA de determinare a elementelor Cu și Zn din ser

Metoda SAA de determinare a elementelor Cd și Pb din sânge integral

Elaborare specificații soft bază de date: Datele studiului clinic

Etapa II

Evaluare oligoelemente din probe biologice

Metode de determinare a oligoelementelor Pb, Cd, Se din fluide biologice - analiza sangelui

Analiza macro și microelementelor din probe biologice este una dintre cele mai avansate metode din medicină, cu aplicații în ceea ce privește spectrul terapeutic. Cercetările arată că relația între concentrațiile micro și macroelementelor din ser, plasmă, sânge integral, urina, țesuturi, fire de păr, unghii etc. și sănătatea umană este un proces complex, legat de expunerea, absorbția și distribuția tisulară a elementelor esențiale precum și a celor toxice. De cele mai multe ori enzimele necesită pentru a opera cofactori minerali. Excesele sau deficiturile minerale au un impact semnificativ asupra sănătății. De mai mult de 30 de ani se studiază utilitatea măsurării concentrației mineralelor în firul de păr, sânge și urina. Aceste medii biologice reflectă echilibrul dinamic al organismului.

Micro și macroelementele toxice sunt epurate rapid din sânge, de aceea nivelurile lor sanguine pot avea relevanță doar o scurtă perioadă de timp. Cadmiul, de exemplu, are o semivie biologică de peste 10 ani la om din care cauză depunerea cumulativă a cadmiului precum și a altor minerale reprezintă un mare risc. Se recomandă pentru o prezentare generală a stării de sănătate a organismului adunarea datelor de referință și includerea lor ca parametri utili și stabili ai funcțiilor biologice. Răspunsul homeostatic ilustrează eficacitatea mecanismelor de curățare din organism și explică utilitatea doar pe termen scurt a analizelor de sânge. Este importantă deci investigarea capacității de depozit pentru diferite elemente, în special pentru cele toxice. De asemenea furnizează informații despre substanțele *recent absorbite în sânge* (ore-zile). Nivelurile sanguine sunt independente de cele din țesuturile de depozit și variază și în funcție de componenta analizată (plasmă, ser, eritrocite). Aceste niveluri sunt tranzitorii și sunt supuse mecanismelor homeostatice care le mențin într-o plajă îngustă de valori.

Determinare a elementelor Cd, Pb din sânge integral prin SAA

Determinare elementelor Cd și Pb se poate face prin următoarele metode: directă cu soluție apoasă și metoda adaosului standard: sol. standard de Cd (1000mg/l) și Pb Cd (1000mg/l).

Reactivi: Acid azotic (HNO₃), sol. 0,1%; Fosfat acid de amoniu (NH₄H₂PO₄), sol. 0,2%; Triton X-100, sol. 0,3%; Metanol (CH₃OH); Fenol (C₆H₅OH); Soluție standard de Pb conc. 1000mg/l (soluție stoc); Soluție standard de Cd conc. 1000ppm (soluție stoc).

Se efectuează curba de calibrare folosind metoda soluției apoase sau metoda adaosul soluției standard de Cd și Pb de concentrații cunoscute. Probele de sânge se diluează în raport de 1:3 cu un amestec de NH₃ : Na EDTA : NH₄H₂PO₄. La probele de sânge integral se adaugă volume diferite din soluții standard și apoi se supun citirii și cuantificării conținutului de elemente prin GF-AAS.

Concluzii

Rezultatele obținute prin AAS, metoda directă a soluției apoase demonstrează că gradientul liniei de calibrare este comparabil cu cel al metodei adaosului standard. Diferențele sunt relativ mici, indicând interferenți nesemnificativi. În această situație metoda directă a soluției apoase este folosită cu succes.

Elaborare și realizare bază de date

Termenul “bază de date” are diferite conotații în funcție de persoana care îl utilizează sau de domeniul în care este folosit. În general, o bază de date înseamnă o colecție de câmpuri și înregistrări care stochează o cantitate de date corelate, în vederea folosirii lor ulterioare.. Într-un mod mai particular, programul **MS Access 2003**, din suita MS Office 2003, vede o bază de date ca o colecție de tabele, cereri, formulare, rapoarte, macrouri și module care împreună formează un sistem complet, interdependent..

Valorile seleniului, cadmiului și plumbului din ser la pacienti (LotA)

Nr crt	Cod proba	Elemente determinate [ppb]		
		Se [ppb]	Cd [ppb]	Pb [ppb]
1	S-8	95.8 ± 0.6	0.97 ± 0.30	39.1 ± 1.6
2	S-9	78.1 ± 4.5	0.98 ± 0.31	45.5 ± 2.3
3	S-10	101 ± 6	1.78 ± 0.02	98.9 ± 3.4
4	S-11	76 ± 3.1	1.56 ± 0.32	40.3 ± 4.0
5	S-12	98.6 ± 1.2	1.68 ± 0.27	58.1 ± 1.6
6	S-16	92.4 ± 9.1	1.09 ± 0.28	160 ± 5
7	S-17	77.2 ± 6.9	1.25 ± 0.46	121 ± 2
8	S-18	125 ± 16	1.89 ± 0.34	83.2 ± 3.0
9	S-19	107 ± 7	1.96 ± 0.29	138 ± 4
10	S-20	92.4 ± 12.2	1.19 ± 0.24	247 ± 4
11	S-21	83.1 ± 7.0	0.97 ± 0.27	155 ± 4

Valorile seleniului, cadmiului și plumbului din ser la martori (LotB)

Nr crt	Cod proba	Elemente determinate [ppb]		
		Se [ppb]	Cd [ppb]	Pb [ppb]
1	MS-1	85.9 ± 5.2	0.83 ± 0.38	54.8 ± 1.5
2	MS-5	83.3 ± 2.4	1.23 ± 0.25	238 ± 9
3	MS-7	74.1 ± 1.0	1.83 ± 0.32	167 ± 5
4	MS-13	110 ± 2	1.33 ± 0.34	28.1 ± 7.2
5	MS-16	98.7 ± 4.2	1.18 ± 0.11	153 ± 4
6	MS-22	95.8 ± 2.1	0.89 ± 0.25	63.1 ± 1.9
7	MS-23	102 ± 1	1.11 ± 0.36	59.4 ± 2.5
8	MS-24	116 ± 3	1.25 ± 0.46	91.1 ± 2.3

9	MS-26	117 ± 4	0.82 ± 0.36	52.5 ± 2.5
10	MS-27	114 ± 1	1.99 ± 0.69	74.4 ± 1.0
11	MS-29	110 ± 5	0.57 ± 0.04	45.5 ± 1.2
12	MS-30	112 ± 8	0.1 ± 0.06	154 ± 4
13	MS-31	lipsa		
14	MS-32	125 ± 6	< 0.06	51.2 ± 2.2

Limita de detectie = Ld = 0.06 ppb

Nr crt	Cod proba	Elemente determinate [ppb]		
		Se [ppb]	Cd [ppb]	Pb [ppb]
1	MS-1	85.9 ± 5.2	0.83 ± 0.38	54.8 ± 1.5
2	MS-2	93.0 ± 3.3	2.32 ± 0.26	175 ± 5
3	MS-3	79.8 ± 1.1	3.68 ± 0.15	275 ± 8
4	MS-4	107 ± 3	1.06 ± 0.36	172 ± 7
5	MS-5	83.3 ± 2.4	1.23 ± 0.25	238 ± 9
6	MS-6	lipsa		
7	MS-7	74.1 ± 1.0	1.83 ± 0.32	167 ± 5
8	MS-8	122 ± 4	3.29 ± 7.78	391 ± 13
9	MS-9	84.9 ± 2	3.37 ± 0.25	544 ± 19
10	MS-10	120 ± 2	1.77 ± 0.20	697 ± 25
11	MS-11	93.8 ± 0.1	0.77 ± 0.12	59.8 ± 1.8
12	MS-12	86.7 ± 2.9	2.49 ± 0.23	436 ± 16
13	MS-13	110 ± 2	1.33 ± 0.34	28.1 ± 7.2
14	MS-14	70.7 ± 6.3	2.18 ± 0.05	131 ± 4
15	MS-15	85.5 ± 2.7	1.99 ± 0.12	92.5 ± 3
16	MS-16	98.7 ± 4.2	1.18 ± 0.11	153 ± 4
17	MS-17	124 ± 1	1.35 ± 0.41	79.4 ± 2.4
18	MS-18	76.3 ± 1.4	0.76 ± 0.06	84.2 ± 2.6
19	MS-19	92 ± 8.6	0.85 ± 0.05	54.6 ± 5.5
20	MS-20	79.3 ± 4.4	1.4 ± 0.42	110 ± 3
21	MS-21	70.3 ± 6.5	1.11 ± 0.40	120 ± 3
22	MS-22	95.8 ± 2.1	0.89 ± 0.25	63.1 ± 1.9

Nr crt	Cod proba	Elemente determinate [ppb]		
		Se [ppb]	Cd [ppb]	Pb [ppb]
1	S-8	95.8 ± 0.6	0.97 ± 0.30	39.1 ± 1.6
2	S-9	78.1 ± 4.5	0.98 ± 0.31	45.5 ± 2.3
3	S-10	101 ± 6	1.78 ± 0.02	98.9 ± 3.4
4	S-11	76 ± 3.1	1.56 ± 0.32	40.3 ± 4.0
5	S-12	98.6 ± 1.2	1.68 ± 0.27	58.1 ± 1.6
6	S-16	92.4 ± 9.1	1.09 ± 0.28	160 ± 5
7	S-17	77.2 ± 6.9	1.25 ± 0.46	121 ± 2
8	S-18	125 ± 16	1.89 ± 0.34	83.2 ± 3.0
9	S-19	107 ± 7	1.96 ± 0.29	138 ± 4
10	S-20	92.4 ± 12.2	1.19 ± 0.24	247 ± 4
11	S-21	83.1 ± 7.0	0.97 ± 0.27	155 ± 4

Nr crt	Cod proba	Elemente determinate [ppb]		
		Se [ppb]	Cd [ppb]	Pb [ppb]

1	MS-23	102 ± 1	1.11 ± 0.36	59.4 ± 2.5
2	MS-24	116 ± 3	1.25 ± 0.46	91.1 ± 2.3
3	MS-25	75.3 ± 1.9	0.50 ± 0.02	26.6 ± 3.5
4	MS-26	117 ± 4	0.82 ± 0.36	52.5 ± 2.5
5	MS-27	114 ± 1	1.99 ± 0.69	74.4 ± 1.0
6	MS-28	131 ± 4	1.6 ± 0.51	62.4 ± 2.1
7	MS-29	110 ± 5	0.57 ± 0.04	45.5 ± 1.2
8	MS-30	112 ± 8	0.1 ± 0.06	154 ± 4
9	MS-31	lipsa		
10	MS-32	125 ± 6	< 0.06	51.2 ± 2.2
11	MS-33	96.6 ± 6.8	0.39 ± 0.2	35.8 ± 1.5
12	MS-34	82.9 ± 3.4	0.80 ± 0.01	43.4 ± 16.5
13	MS-35	118 ± 4	1.14 ± 0.6	72.7 ± 2.6
14	MS-36	103 ± 1	0.08 ± 0.05	123 ± 5

Limita de detectie = Ld = 0.06 ppb

Etapa III

Evaluare oligoelemente din probe biologice. Implementare rezultate în baza de date.

Metalele grele inhibă creșterea organismelor și activitatea enzimelor. Ele sunt reținute în țesuturi și fiecare cantitate nouă de elemente pătrunse în organism se adaugă la cea veche. Acest efect cumulativ este întâlnit la plumb, mercur, cadmiu și acționează mereu pe aceleași țesuturi. Gradul de toxicitate pentru organism o reprezintă solubilitatea metalelor și a compușilor metalici și indiferent de sursa de contaminare.

Analiza sângelui furnizează informații despre substanțele recent absorbite în sânge (ore-zile). Pentru mineralele prezente la om, apare o uniformitate a valorilor care reflectă controlul exercitat de către organism care favorizează însă adunarea datelor de referință și includerea lor ca parametri utili și stabili ai funcțiilor biologice.

Elementele determinate

Seleniul - este un microelement esențial și de mare interes în studiul proceselor nutritive și biochimice. La concentrații mari este toxic iar o deficiență în Se a fost corelată cu numeroase tulburări fiziologice. Seleniul este un micronutrient cu mare potențial în prevenirea cancerului. Deficiența de seleniu contribuie la apariția unui mare număr de afecțiuni, printre care cele mai simple sunt: xerodermia, cataracta, astenia, afectarea utilizării vitaminei E.

Cadmiul - este un element omniprezent în sol, fiind deosebit de toxic pentru plante, animale și om, Cadmiul este considerat element cancerigen, se acumulează în țesuturi, iar ingerarea cronică a acestui element duce la perturbări ale structurii și funcției renale, în timp ce expunerea prin inhalare este răspunzătoare de cancer pulmonar și disfuncții renale. Oamenii asimilează cadmiul în principal prin intermediul alimentației. În cazul celor care fumează are loc o expunere la o concentrație semnificativă de cadmiu.

Zincul - acționează în organism ca un veritabil "agent de circulație". Controlează și reglează procesele metabolice, activitatea enzimelor și menține integritatea celulelor. *Zincul este indispensabil* în biosinteza proteinelor și implicat a acizilor nucleici, ADN și ARN. Carența de zinc determină reținerea unei cantități mai mari de plumb și cadmiu în organism, iar administrarea de suplimente alimentare cu zinc reduce fixarea acestor elemente toxice în corp.

Cuprul - ajută corpul nostru să absoarbă și să folosească fierul ca să sintetizeze hemoglobina, menține integritatea mielinei. Niveluri anormal de ridicate ale cuprului în sânge sunt adesea

constatate la oameni cu infecții virale, artrite reumatoide, infarct de miocard, leucemie și anumite tipuri de cancer.

Plumbul - reprezintă cel mai frecvent metal întâlnit în cazul expunerii cronice la minerale toxice în concentrații mici. Plumbul produce intoxicații grave urmările constând în imbolnăvirile cronice. *Determinarea metalelor grele Cd, Cu, Pb, Zn, Se din fluide biologice din sânge s-au efectuat cu ajutorul*

aparaturii: ICP MS.

Pentru stabilirea metodologiei de analiză a probelor de sânge s-au utilizat o serie de:

- *materiale de referință certificate - CRM-uri pentru fluide biologice* (probe certificate cu valori cunoscute ale elementelor de studiat).

- *reactivi ultrapuri* : apă Milli-Q; soluții stoc monoelement de etalonare conc. 1000 ppm [mg/ml] de Cd, Cu Pb, Zn, Se - Merck ; soluție etalon multielement de concentrație 10 ppb [ng/ml] Cd, 100 ppb Cu, 100 ppb Pb, 1000 ppb Zn ; soluție etalon stoc multielement *ME* (Merck HC684396) de concentrație 10 ppm [ng/ml] pentru Cd, Cu, Pb și de 100 ppm [ng/ml] pentru Zn, Se ; diluent pentru sânge ; metan de puritate 99,9995% a fost utilizat ca și gaz de reacție al aparatului pentru eliminarea interferențelor ionilor moleculari asupra ionilor analit.

Proba sânge de analizat P-s se face prin diluția de 1/10 a probei, cu diluent de sânge.

Curba de calibrare se realizează dintr-o soluție multielement de lucru obținută din soluție stoc multielement *ME*). Soluțiile se aduc la semn cu diluent pentru sânge. Concentrațiile corespunzătoare sunt de 2,0; 10,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 ppb pentru Cd, Cu, Pb sunt și de 20,0; 100,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0 ppb pentru Zn, Se. Blank-ul este diluentul de sânge utilizat la prepararea soluțiilor etalon. *Determinările se pot face și prin metoda adaosului standard*

Au fost determinate concentrațiile oligoelementele : Cd, Cu, Pb, Zn , Se din probe de sânge recoltate de la lotul- pacienți și lotul-martori, prin ICP-MS cu spectrometrul ELAN DRC II.

Rezultatele obținute în urma măsurătorilor sunt prezentate în tabele și exprimate în ppb [μg/l] .

Metoda de analiză utilizează curbele de calibrare pentru grupuri de elemente sau monoelemente;. Metoda determinării elementelor prin ICP-MS este deosebit de sensibilă, elementele fiind determinate cu DRC.

Datorită volumului mare de informații care trebuie stocate cu privire la starea, tratamentul și evoluția unui pacient, se impune realizarea unei baze de date pentru stocarea acestor date centralizat, în format digital.

Dintre avantajele unei astfel de soluții se pot enumera: acces on-line, real-time la informații pentru toți partenerii; centralizarea informațiilor; manipulare facilă a datelor; acces securizat la date specifice; posibilitatea extragerii de diverse rapoarte; generarea de statistici

În vederea realizării bazei de date s-a folosit MySQL 5.0.37, cu specificația ca s-a utilizat StorageEngine-ul *InnoDB* și Collation-ul *latin2_bin*, pentru a putea manipula date în format text care conțin diacritice românești.

Etapa IV

Comunicare-poster prezentată la al XIII-lea Congres National de Farmacie, 28-30 sept.2006, Cluj-Napoca s-a prezentat un poster *Study for the determination of Cd, Pb and Zn in biological fluids by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Monica Ursu, Maria Paul, Marin Senila, Tiberiu Frentiu, Mircea Chintoanu, Claudiu Tanaselia. Rezumatul lucrării a fost prezentat în volumul de rezumate apărut cu ocazia desfășurării Congresului.

Pentru o mai bună prezentare a activităților și rezultatelor obținute în cadrul proiectului s-a realizat un CD cu rezultatele obținute precum și cu prezentarea comunicărilor și articolelor prezentate la manifestările științifice la care au participat membrii echipei de lucru.

Organizarea și desfășurarea mesei rotunde: stabilirea tematicii, trimiterea invitațiilor, asigurarea suportului logistic

Masă rotundă *Markeri endofenotipici și susceptibilitate genetică în schizofrenie*,
Marți, 13 noiembrie 2007, sediul ICIA, Str.Donath, nr.67,