

# Spolne razlike u osteotropnim elementima u ljudskoj kosi i krvi

---

**Prejac, Juraj**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:813903>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Juraj Prejac**

**Spolne razlike u osteotropnim  
elementima u ljudskoj kosi i krvi**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Juraj Prejac**

**Spolne razlike u osteotropnim  
elementima u ljudskoj kosi i krvi**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2018.**

Disertacija je izrađena u Institutu za istraživanje i razvoj održivih eko sustava (IRES)

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Ninoslav Mimica, dr. med., spec. psihijatrije

Su-Voditelj rada: dr. sc. Berislav Momčilović, dr. med., znanstveni savjetnik, spec. interne medicine i spec. medicine rada

Zahvaljujem svojim mentorima, učiteljima i prijateljima, Prof.dr.sc. Ninoslavu Mimicu i dr.sc. Berislavu Momčiloviću, znanstvenom savjetniku, koji su prenijeli na mene svoje znanje, iskustvo i bez čije podrške ne bi uspio u ovom zadatku. Mojoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na ljubavi i bezuvjetnoj podršci.

## SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Bioelementi	1
1.2	Predmet istraživanja	3
1.3	Kosa i krv kao bioindikatorska tkiva (matrice)	4
1.4	Terminologija	6
1.5	Znanstveni doprinos	7
1.6	O istraživanim elementima (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn)	8
1.6.1	Bor (B)	8
1.6.1.1	Uvod	8
1.6.1.2	Fizikalna i kemijska svojstva	9
1.6.1.3	Unos, apsorpcija i metabolizam	9
1.6.1.4	Utjecaj na zdravlje	10
1.6.2	Barij (Ba)	12
1.6.2.1	Uvod	12
1.6.2.2	Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	13
1.6.2.3	Unos, apsorpcija i metabolizam	13
1.6.2.4	Utjecaj na zdravlje	14
1.6.3	Kalcij (Ca)	15
1.6.3.1	Uvod	15
1.6.3.2	Fizikalna i kemijska svojstva	16
1.6.3.3	Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	16
1.6.3.4	Unos, apsorpcija i metabolizam	17
1.6.3.5	Utjecaj na zdravlje	21

1.6.4	Magnezij (Mg)	23
1.6.4.1	Uvod	23
1.6.4.2	Fizikalna i kemijska svojstva	23
1.6.4.3	Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	24
1.6.4.4	Metabolizam i utjecaj na zdravlje	25
1.6.5	Fosfor (P)	28
1.6.5.1	Uvod	28
1.6.5.2	Fizikalna i kemijska svojstva	28
1.6.5.3	Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	29
1.6.5.4	Metabolizam	30
1.6.5.5	Utjecaj na zdravlje	30
1.6.6	Silicij (Si)	32
1.6.6.1	Uvod	32
1.6.6.2	Fizikalna i kemijska svojstva	32
1.6.6.3	Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	31
1.6.6.4	Unos, apsorpcija i metabolizam	33
1.6.6.5	Utjecaj na zdravlje	34
1.6.7	Stroncij (Sr)	36
1.6.7.1	Uvod	36
1.6.7.2	Fizikalna i kemijska svojstva	36
1.6.7.3	Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	37
1.6.7.4	Unos, apsorpcija i metabolizam	37
1.6.7.5	Utjecaj na zdravlje	38
1.6.8	Cink (Zn)	39
1.6.8.1	Uvod	39

	1.6.8.2 Fizikalna i kemijska svojstva	40
	1.6.8.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima	40
	1.6.8.4 Unos, apsorpcija i metabolizam	41
	1.6.8.5 Utjecaj na zdravlje	42
2	HIPOTEZA	44
3	CILJEVI RADA	45
	3.1 Glavni cilj istraživanja	45
	3.2 Specifični ciljevi istraživanja	45
4	MATERIJALI I METODE	46
	4.1 Uvod	46
	4.2 Sakupljanje i obrada uzoraka	47
	4.3 Statističke metode	49
	4.3.1 Faktorska analiza	49
	4.3.2 Mjere varijabilnosti	50
	4.3.3 Korelacija: Pearsonov i Spearmanov test	50
	4.3.4 Mann-Whitney <i>U</i> test	52
	4.3.5 Derivati medijana	53
	4.3.6 <i>Software</i>	53
5	REZULTATI	54
	5.1 Deskriptivna statistika	54
	5.1.1 Kosa	54
	5.1.2 Krv	54
	5.1.3 Dob	55
	5.2 Usporedba između skupina po spolu: Mann-Whitney <i>U</i> test	56
	5.2.1 Kosa	56



5.2.2	Krv	62
5.3	Grupiranje po spolu, dobi i koncentraciji elemenata	68
5.3.1	Faktorska analiza	68
5.3.1.1	Kosa	68
5.3.1.2	Krv	73
5.3.2	Korelacija ranga: Spearmanov test	77
5.3.2.1	Kosa	77
5.3.2.2	Krv	80
5.3.3	Linearna korelacija	83
5.4	Korelacija koncentracije pojedinih elemenata u kosi i krvi	89
5.5	Referentni intervali za određivanje adekvatnog nutritivnog statusa ili izloženosti elementima B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn	91
5.6	Komparativna multielementna analiza	125
6	RASPRAVA	128
6.1	Kosa i krv kao biomarkeri	137
6.2	Logističke krivulje derivata medijana	140
6.3	Elementi	142
6.3.1	Kalcij (Ca)	142
6.3.2	Cink (Zn)	144
6.3.3	Fosfor (P)	145
6.3.4	Magnezij (Mg)	148
6.3.5	Silicij (Si)	150
6.3.6	Stroncij (Sr)	151
6.3.7	Bor (B)	153
6.3.8	Barij (Ba)	154

6.1	Zaključna rasprava	156
7	ZAKLJUČAK	158
8	KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU	160
9	NASLOV I KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU ( <i>SUMMARY</i> )	161
10	LITERATURA	162
11	APENDIKS	195
12	BIOGRAFIJA	208

# 1 UVOD

## 1.1 Bioelementi

Dugo se zna za razlike u tjelesnom sastavu muškaraca i žena. Žene imaju zamjetno više masnog tkiva nego muškarci i različiti bioelektrični otpor <sup>1</sup>, energetske potrebe žena su manje <sup>2</sup>, žive dulje od muškaraca <sup>3</sup>, i imaju niže koncentracije željeza u krvi u usporedbi s muškarcima <sup>4</sup>. Sve to upućuje na moguće razlike osobito u metabolizmu bioelemenata ovisno o spolu ispitanika o čemu do sada nije bilo ozbiljnijeg istraživanja <sup>5</sup>.

Čovjekov organizam sazdan je od elemenata koji se u njemu nalaze u različitim koncentracijama i omjerima ovisno od tkiva do tkiva, odnosno od jedne do druge biološke matrice. Bioelementi (minerali, elementi u tragovima i ultrarijetki elementi) nisu izvor energije u čovjekovom metabolizmu te ne daju tijelu energiju, već pomažu u produkciji energije i u drugim kemijskim reakcijama kao sastavni dijelovi enzima koji stupaju u brojne interakcije. Ponekad su elementi sastavni dio enzima koji reguliraju druge biološke funkcije kao što su hormoni. Ovakva biološka amplifikacija objašnjava kako svega stotinu nanograma nekog elementa poput kobalta (sastavni dio vitamina B12) može biti čimbenik koji odlučuje o životu i smrti odrasle osobe koja teži oko trilijun puta više <sup>6</sup>. Neki elementi su neophodni za zdrav život, neki su otrovni već u izrazito niskim koncentracijama, a za neke nemamo jasne spoznaje da li nam uopće trebaju. Mjerenje koncentracije elemenata u pojedinim biološkim matricama omogućuje nam uvid u promjenu stanja metaboličke dinamike u normalnim i patološkim procesima u organizmu. Dosadašnje spoznaje o metabolizmu elemenata u organizmu odnosile su se pretežno na metaboličke procese pojedinih elemenata u različitim biološkim tkivima <sup>7-10</sup>.

S obzirom na starenje populacije, promjene u metabolizmu bioelemenata vezane uz dob i spol, poput osteoporoze, danas su značajan svjetski javno zdravstveni i klinički problem uključivo i Republiku Hrvatsku. Zato su za očuvanje zdravlja i sprečavanje bolesti neophodno potrebni pouzdani bioindikator za individualnu procjenu metaboličkog statusa bioelemenata u organizmu, posebice elemenata koji izgrađuju kost. Krv i kosa su dva lako dostupna indikatorska tkiva prikladna za određivanje metaboličkog statusa. Pogotovo je atraktivna kosa s obzirom na neinvazivnu metodu prikupljanja uzoraka. Pod metaboličkim statusom smatramo izmjerenu koncentraciju elemenata u kosi i krvi. Naime, svi ti elementi raspodjeljuju se u kosu ovisno o aktualnim metaboličkim procesima u organizmu. Prema tome, naša definicija metaboličkog statusa odnosi se na odraz spektra koncentracija elemenata izmjerenih u bioindikatorskim tkivima kose i krvi.

Ne postoji jedinstveno dijagnostičko oruđe za određivanje statusa nekog elemenata u organizmu. Međutim, kao cjelokupni indikator zdravlja i biokemijskog mineralnog statusa, analiza kose je vrlo pogodna metoda. Vrlo je precizna i za određivanje izloženosti nekim toksičnim elementima kao što su olovo, kadmij, arsen i živa <sup>11</sup>. Kosa je poput pomične trake koja zapisuje promjene mineralnog statusa u određenom vremenskom trenutku. Kako kosa raste oko jedan milimetar svaka tri dana, vlas kose dužine 1 cm zapisat će sve metaboličke promjene u organizmu i folikulu dlake kroz to vrijeme. Ustanovljeno je da je mitotska aktivnost matriksa dlake, uz iznimku stanica koštane srži, najviša od svih ostalih tkiva <sup>12</sup>. Prednosti kose kao indikatorskog tkiva su sljedeće: (1) uzorci kose su biološki stabilni, jednostavno se pohranjuju i prenose te ne propadaju, (2) jednostavno ih je prikupiti netraumatskom i neinvazivnom metodom, (3) ne podliježe homeostatskoj reverzibilnoj ekvibraciji između različitih biokemijskih prostora za razliku od krvi i urina, (4) odražava metaboličke aktivnosti bioelemenata u tkivu, (5) jednostavnija je za analizu od mnogih

drugih bioloških uzoraka, i (6) odražava ukupnost metaboličkih procesa tijekom duljeg vremenskog razdoblja <sup>8,13</sup>.

U protekla tri desetljeća metoda analize elemenata u kosi pokazala se pouzdanom za određivanje metabolizma niza elemenata te za procjenu metaboličkog statusa organizma <sup>6,14</sup>. Odlaganje elemenata u kosu je nepovratan, jednosmjernan proces koji ne podliježe negativnoj povratnoj sprezi. Analiza krvi tradicionalno je istraživanja i poznatija metoda od analize kose, a sve više istraživanja govori da su to dva neovisna bioindikatorska tkiva i da ne mora postojati značajna korelacija između sadržaja elemenata <sup>15</sup>.

## 1.2 Predmet istraživanja

Kao specifični pokazatelji metaboličkog odnosno nutritivnog statusa bioelemenata u pojedinaca, određivali smo koncentracije elemenata u kosi i krvi od 192 ispitanika (109 žena i 83 muškarca). Istraživani elementi su oni koji pokazuju afinitet za odlaganje u kost (osteotropni): bor (B), barij (Ba), kalcij (Ca), magnezij (Mg), fosfor (P), silicij (Si), stroncij (Sr) i cink (Zn) <sup>16</sup>. Budući da kalcij čini oko 99% suhe tvari kosti, isti je uzet kao osnova prema s kojom su korelirani ostali elementi koji se odlažu u kost, odnosno sličnosti i razlike u njihovoj depoziciji u kosi i krvi u osoba različitog spola. Istraživani elementi većinom se nalaze u s-bloku periodnog sustava elemenata <sup>17,18</sup>. Osim tih, u skelet se odlažu i toksični elementi – olovo, fluor i kadmij <sup>16</sup> koji nisu uključeni u ovo istraživanje.

Kada govorimo o toksičnosti elemenata u tragovima, zanimljivo je uočiti da su u proteklih nekoliko desetljeća istraživanja dokazala esencijalne uloge nekih elemenata (npr. selen, krom i arsen) za koje se do tada smatralo da su samo toksični <sup>9</sup>.

### 1.3 Kosa i krv kao bioindikatorska tkiva (matrice)

Najviše spoznaja imamo o toksičnim elementima <sup>19,20</sup>, a postaje sve očiglednije da je analiza kose pogodna za otkrivanje metaboličkog poremećaja i deficita i pojedinih esencijalnih elemenata <sup>10,14</sup>. Unutar istog laboratorija nalazi su reproducibilni i pouzdani za analizu individualnog nutritivnog statusa <sup>1,22</sup>. Milekeley i sur. <sup>23</sup> dokazali su kako je kosa pouzdani indikator metabolizma Ca u organizmu, odnosno njegovog nutritivnog statusa. Znamo da se gustoća kosti i sastav razlikuje ovisno o spolu, mjestima u skeletu, a razlikuje se i sklonost frakturama kod potpuno istog unosa Ca <sup>24</sup>. Žene imaju manju gustoću mjerenu na distalnom radijusu, a veću u lumbalnoj kralježnici i vratu femura <sup>24</sup>. Razina svih biljega koštane pregradnje (koštana alkalna fosfataza, prokolagen-I C terminalni propetid, osteokalcin i urinarni N-telopeptid tipa I kolagena) raste s dobi u žena. Istodobno smanjuje se i gustoća kosti. Nadalje, povišeni biljezi koštane pregradnje koji ukazuju na bržu stopu koštanog obrtaja (engl. *turnovera*) povezani su sa smanjenom koštanom masom u oba spola <sup>25</sup>. The US Environmental Protection Agency (EPA) i International Atomic Energy Agency Vienna (IAEA) prihvaćaju analizu kose za određivanje razine toksičnih i esencijalnih elemenata <sup>26,27</sup>.

Od ispitivanih elemenata neki imaju jasno određenu ulogu u koštanom metabolizmu (Ca, Mg, P, Zn), neki ne potpuno jasnu fiziološku funkciju (Si, Sr, B), dok za Ba nemamo podataka je li u fiziološkim koncentracijama kakve nalazimo u kosti toksičan. Vrijednosti makroelemenata (Ca, Mg, P) i nekih elemenata u tragovima (Zn) u biološkim uzorcima, prvenstveno serumu, često su određivane te stoga njihove vrijednosti imaju poznate referentne raspone većim dijelom zbog potrebe kliničke prakse <sup>8</sup>, dok dozvoljeni rasponi normalnih vrijednosti za većinu ostalih elemenata u

tragovima (B, Ba, Si, Sr) nisu određeni. Pijedinačna istraživanja na većim uzorcima za neke elemente (Ca, Mg, Zn) navode razlike koncentracija ovisnih o spolu <sup>29,30</sup>.

I ranije se analiza elemenata koristila za procjenu koštanog obrtaja u patološkim stanjima npr. u pacijenata na hemodijalizi. Potvrđene su povišene vrijednosti Ca i Mg, a uz njih i Fe, Al i Cr u kosi, ali i u krvi bez značajnije korelacije između tkiva <sup>31</sup>. Visoke vrijednosti Ca u kosi korištene su kao indikator poremećaja u metabolizmu Ca i kosti <sup>23</sup>. Uz to, smatra se da su razine Ca i Mg u kosi predmenopauzalnih žena pouzdaniji pokazatelj koštane mineralne gustoće kralježnice od njihovih vrijednosti u serumu <sup>32</sup>. U literaturi ne postoji mnogo podataka o spolnim razlikama ovih 8 elemenata u uzorcima kose i pune krvi. Opisana je razlika u slučaju Ca, Mg i Zn u poljskoj populaciji <sup>30,31</sup> gdje žene imaju više Ca i Mg u kosi bez objašnjenja etiologije. Također, u kosi postoji povećanje omjera Ca/P i Ca/Mg ovisno o dobi uz značajno veći omjer Ca/P u ženskoj populaciji <sup>33</sup>. Korelaciju između Ca i Mg potvrdili su i drugi autori no bez odnosa koncentracije elementa naspram dobi ispitanika <sup>34</sup>. Poznato je da estrogen ima snažan učinak na minerale i funkcije u čijim regulacijama sudjeluju. To se odnosi na Ca, K i Cu, a u manjoj mjeri i na Mg, Na, Zn i P <sup>35</sup>. Naše istraživanje na 311 ispitanika dokazalo je da žene imaju značajno višu koncentraciju Sr u kosi od muškaraca, neovisno o dobi <sup>36</sup>.

Maugh <sup>37</sup> je predložio da analiza minerala u kosi ima potencijal da upotpuni urin i krv kao dijagnostičko sredstvo. Koncentracija elemenata u kosi 10-50 je puta viša u usporedbi s onom u krvi (osim Fe, Mn i P), a lakše se analizira zbog odsustva kompleksnih proteina, porfirina, šećera i drugih spojeva u krvi <sup>38</sup>.

Kemijski sastav keratina čvrsto veže elemente u kosi što gotovo onemogućuje da se oni izgube iz strukture vlasi <sup>39</sup>. S ovim spoznajama, Sanford i Kissling <sup>40</sup> te Bergfield <sup>41</sup> istraživali su koncentracije elemenata u kosi u okviru arheoloških ostraživanja ukazujući na sastav hrane i prehrambene navike pokojnih ispitanika.

Nadalje, da kosa može odražavati promjene u nutritivnom statusu dokazuje i pojava tzv. „kalcijevog paradoksa kose“<sup>42,43</sup>. Kalcijev paradoks je pojava porasta Ca, Mg, Si i B u kosi osoba koje imaju osteopeniju usprkos očekivanim sniženim vrijednostima. Koncentracija Ca i Mg pada nakon provedene adekvatne nadoknade tih elemenata. Također, pacijenti s bubrežnim zatajenjem, od kojih su neki u programu kronične hemodijalize, imaju povišene vrijednosti Ca i Mg u kosi<sup>44</sup>. Opisani su i slučajevi gdje je visok sadržaj Ca i Mg u kosi prethodio pozitivnom nalazu denzitometrije u smislu osteoporoze<sup>45</sup> kao i u slučaju hiperparatireoidizma u ženske osobe gdje je promijenjena ugradnja Ca u kosti<sup>23</sup>.

Više studija bavilo se pitanjem vanjskih utjecaja kao što je pušenje ili utjecaja boje kose na koncentracije elemenata. Opisalo je zavisni odnos Ca i Zn te Ca i Zn s još nekim elementima (Pb, Mn, Ni, Na, K) koristeći cluster analizu, faktorsku analizu i multiplu linearnu regresiju na 266 ispitanika u Poljskoj. U toj studiji nije nađen utjecaj dobi odnosno boje kose<sup>46</sup>. Potencijalan utjecaj dobi i boje kose na sadržaj Zn nije dokazalo niti istraživanje na 607 muškaraca i 649 žena objavljeno dvije godine ranije<sup>47</sup>. Boja kose i vanjski utjecaju poput pušenja na koncentracije elemenata nadilaze okvire ovog istraživanja.

#### 1.4 Terminologija

Činjenica da se više elemenata može istodobno odrediti u njihovom međusobnom kontekstu pretpostavlja i razvoj određene terminologije da opiše takvu situaciju. U ovom istraživanju određujemo 8 elemenata u istome uzorku određene biološke matrice (kosa i krv) što znači da elemente promatramo ne više pojedinačno nego kao mrežu mogućih međusobnih interakcija. Još od međunarodnog skupa o elementima u tragovima (TEMA7) postavlja se pitanje kako nazvati jednu takvu



ukupnost mogućih interakcija više elemenata, jer je termin *trace elements* (engl.), *oligoelementes* (fra.) ili *Spuren Elementen* (njem.) koji se danas rabe za pojedine elemente ovisno o njihovoj koncentraciji u čovjeku i njegovoj okoline opsolentan. Smatramo da je pravilnije koristiti pojam *bioelementi* što u suvremenoj znanstvenoj anglo-saksonskoj literaturi uključuje major *elements/electrolytes*, *trace elements* i *ultra-trace elements*. Tim više jer je naziv elementi u tragovima nastao krajem XIX. stoljeća kada analitičke metode nisu bile tako razvijene kao što su danas, pa se neke elemente moglo odrediti samo kvalitativno. Naime, koncentracije tih elemenata koje se u organizmu nalaze u vrlo malim količinama možemo danas precizno kvantitativno analizirati.

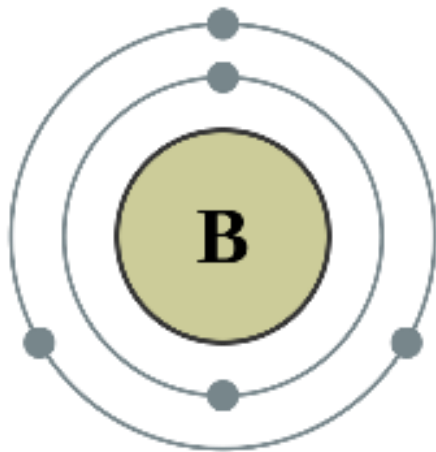
## 1.5 Znanstveni doprinos

Radi se o prospektivnom opservacijskom eksplorativnom kliničkom, epidemiološkom i laboratorijskom istraživanju sa novim spoznajama o međusobnim sastavnim ovisnostima bioelemenata u bioindikatorskim matricama kose i krvi i mogućim interakcijama bioelemenata unutar prihvaćenih fizioloških granica. Po prvi puta se promatra cijelokupna matrica elemenata u kontekstu njihova međudjelovanja unutar bioindikatorskog tkiva kose i krvi, za razliku od dosadašnjih simplicističkih redukcijskih modela u kojima variramo samo jedan po jedan čimbenik unutar sustava promatranja. Rezultat praćenja metabolizma bioelemenata u bioindikatorskim matricama kose i krvi omogućuje nam nove spoznaje o svojstvima i ponašanju osteotropnih elemenata u osoba različitog spola.

## 1.6 O istraživanim elementima (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn)

### 1.6.1 Bor (B)

#### 1.6.1.1 Uvod



Bor je kemijski element koji tvori otprilike 230 spojeva sa drugim elementima <sup>10</sup>. Nalazi se u visokim koncentracijama u stijenama, tlu, ugljenu i morskoj vodi. Procjenjuje se da je globalna koncentracija bora u moru 4600 mg·ml<sup>-1</sup>, a 65 – 85% bora u atmosferi dolazi iz oceana <sup>48</sup>. Ovaj element u tragu unosi se u organizam na dnevnoj bazi, a količina ovisi o

koncentraciji u jelu i piću <sup>49</sup>. Mnoga istraživanja ukazuju da bi bor mogao biti esencijalan za ljude i životinje <sup>50</sup>. Na žalost, točan mehanizam kojim bor utječe na organizme nije u potpunosti jasan.

Bor zadovoljava većinu kriterija kao esencijalni nutrijent <sup>51</sup>. Niske je atomske mase i veže se na organske spojeve na način da utječe na biološke funkcije. U koncentracijama u kojima se uobičajeno nalazi u organizmima nije toksičan i živi organizmi mogu održavati homeostatsku kontrolu nad razinama bora.

Malo se zna o biokemijskoj funkciji bora u ljudi i životinja. Zbog toga što bor utječe na metabolizam steroidnih hormona u ljudi <sup>52,53</sup> i zbog toga što u eksperimentalnim modelima odgovor na manjak bora biva pojačan nutritivnim čimbenicima koji induciraju sekundarni hiperparatireoidizam, npr. manjak magnezija <sup>54</sup>,

za očekivati je da bor utječe na metabolizam biološki najvažnijih minerala putem regulacijskih puteva koji uključuju hormone.

Nije poznato da bi bor mogao biti nutritivno važan za ljude te tako nisu poznati niti indikatori nutritivnog statusa. Unatoč tome, povišene razine u krvi i urinu indikatori su akutnog povećanog unosa u ljudi i životinja <sup>55</sup>.

#### 1.6.1.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Prvi je element u grupi 13 Periodnog sustava elemenata; atomske mase 10,811 i atomskog broja 5. Razlikuje se od ostalih elemenata u toj grupi po tome što je jedini nemetal (aluminij, galij, indij i talij pripadaju metalima). Spojevi bora korišteni su stoljećima. Najpoznatiji spoj, boraks, dugo je u uporabi u proizvodnji stakla i glazura. Procjenjuje se da se u Zemljinoj kori nalazi 10 ppm bora što ga pozicionira među srednje zastupljene elemente u zemlji. Ne dolazi u elementarnom obliku, već uvijek kao spoj. Najčešći spojevi su boraks ili natrijev borat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), kernit, kolemanit, kalcijev borat ( $\text{C}_2\text{B}_6\text{O}_{11}$ ) i uleksit ( $\text{NaCaB}_5\text{O}_9$ ) <sup>56</sup>.

#### 1.6.1.3 Unos, apsorpcija i metabolizam

Bor se u hrani, u obliku natrijevog borata i borne kiseline, brzo apsorbira i izlučuje većim dijelom urinom <sup>55</sup>. Nepoznat je mehanizam kojim se bor apsorbira iz probavnog sustava ili kojim putem se prenosi organizmom. Distribuira se u tkivima i organima životinja i ljudi u koncentracijama između 0,05 i 0,6  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  mase, a nekoliko puta veće koncentracije nalaze se u kostima <sup>53</sup>.

Dnevni unos bora varira ovisno o odnosima određenih namirnica u prehrani. Hrana biljnog podrijetla, osobito voće, lisnato povrće, orašasti plodovi i citrusi bogat su

izvor. Vino i pivo su također bogati borom, za razliku od mesa, ribe i mliječnih proizvoda gdje ga ima malo <sup>10</sup>.

Jednom kada se nađe u tijelu brzo se izlučuje putem urina i ne akumulira u tkivima gdje se nalazi u obliku borne kiseline ( $B(OH)_3$ )<sup>55</sup>. Sadržaj bora u različitim organima se razlikuje; u srcu 28, jetri 2,31, plućima 0,6, bubregu 0,6 i mozgu 0,06 ppm<sup>31</sup>. Bor može utjecati i na sastav i funkciju koštanog i imunološkog sustava<sup>56</sup>. Dnevni unos bora od 3 mg tijekom više od 7 tjedana može spriječiti osteoporozu u postmenopausalnih žena. Nakon što je bor konzumiran kao suplement, izlučivanje esencijalnih elemenata, kalcija i magnezija, urinom smanjuje se za 40, odnosno 33%<sup>50</sup>. Unos bora, također, povećava koncentraciju ioniziranog kalcija u serumu, smanjuje razinu kalcitonina i povećava razinu vitamina D<sup>57</sup>. Prosječan dnevni unos bora varira na dnevnoj bazi, a u odraslih osoba iznosi od 1,2 do 1,5 mg na dan<sup>58</sup>.

#### 1.6.1.4 Utjecaj na zdravlje

Sve je više dokaza da bor može ublažiti simptome ili spriječiti artritis, ima važnu ulogu u rastu kosti, ima pozitivne učinke na središnji živčani sustav, smanjuje rizik od razvoja malignih bolesti i potencira funkciju nekih hormona<sup>59</sup>.

Zna se da bor utječe na aktivnost barem 26 različitih enzima od kojih je većina važna za proizvodnju energije<sup>60</sup>. Može imati vodeću ulogu u kontroli određenih puteva koji koriste serin proteaze (hidrolaze) ili oksidoreduktaze<sup>61,62</sup>. Ti enzimi trebaju piridinske ili flavinske nukleotide (NAD<sup>+</sup>, NADP ili FAD), a tvoreći analogne spojeve za prijelazna stanja ili natječući se za NAD ili FAD, bor reverzibilno inhibira njihovu aktivnost<sup>32,43</sup>. Serin proteaze, kao što je trombin, imaju ulogu u regulaciji koagulacijskih sustava krvi. Također inhibira druge enzime kao što su fosfoglukomutaza,  $\gamma$ -glutamil transpeptidaza (GGT) i gliceraldehid-3-fosfat

dehidrogenaza (GDP) <sup>62</sup>. Ovi podaci ukazuju na to da bor ograničava aktivnost nekih enzima i stabilizira reakcije regulirajući korištenje energetskih supstrata <sup>63</sup>.

Osim u navedenim enzimatskim sustavima, bor utječe na metabolizam nekoliko elemenata kao što su fosfor, magnezij, kalcij i molibden <sup>64</sup>. Regulatorna uloga koju B ima u metabolizmu drugih minerala koji utječu na koštano zdravlje osobito je zanimljiva. Manjak bora remeti ravnotežu koncentracija u plazmi između kalcija, magnezija i fosfora <sup>67</sup>. Dokazano je da suplementacija borom potiče rast i povećava koncentraciju Ca i Mg u plazmi te sprječava kalcifikaciju hrskavice u kokošima sa manjkom vitamina D<sup>51</sup>. Nadalje, uz manjak bora smanjuje se i funkcija osteoblasta i povećava površina kosti koja je u stanju mirovanja<sup>61</sup>. Istraživanja na kulturama stanica također govore u prilog konceptu da bor pozitivno utječe na stvaranja i održavanje kosti. Suplementacija od 1 i 10 ng·ml<sup>-1</sup> u usporedbi s 0 ili 0,1 ng·ml<sup>-1</sup> u kulturi osteoblasta povećava ekspresiju mRNA kolagena tipa 1, osteopontina, koštanog sijaloproteina i osteoklacina, a dodatno povećava i razine morfogogenetskih proteina 4, 6 i 7 <sup>66</sup>.

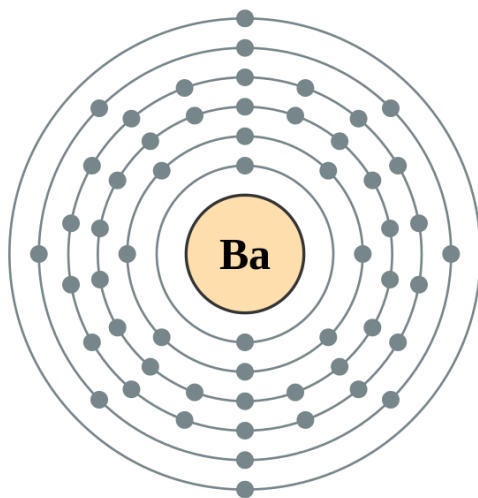
Istraživanja na životinjama pokazala su da se toksičnost manifestira kada je unos bora iznad 100 µg·g<sup>-1</sup> <sup>58</sup>. Doza od 17,5 mg B/kg na dan (razina B u krvi od 2,020 ng·g<sup>-1</sup>) utjecala je na plodnost, a 9,6 mg B/kg na dan (razina u krvi 1,270 ng·g<sup>-1</sup>) na normalan razvoj štakora koji su bili izloženi <sup>67,68</sup>.

U ljudi, simptomi akutne toksičnosti uslijed pretjerane izloženosti boru su mučnina, povraćanje, proljev i umor <sup>58</sup>, dok su znaci kronične toksičnosti gubitak apetita, mučnina, gubitak na težini, smanjenje spolne želje, volumena sjemene tekućine, broja i motiliteta spermija <sup>58</sup>. Točna granica za manifestnu toksičnost još nije poznata. Duydu <sup>69</sup> je mjerio koncentraciju bora u krvi radnika koji su u kontaktu sa bornom kiselinom i njihova srednja vrijednost iznosila je 0,224 µg·g<sup>-1</sup> što je oko 9 puta

niže od koncentracija koje su negativno utjecale na plodnost štakora, odnosno 6 puta niža od one koja je utjecala na njihov razvoj. U tim koncentracijama bora u krvi nije zabilježeno negativnih učinaka. Radnici koji su bili izloženi najvišim vrijednostima (125 mg B na dan) također nisu imali negativnih učinaka na karakteristike sjemena <sup>68</sup>. Zaključak je da ljudima dostupna dnevna izloženost boru nije dovoljna da negativno utječe na reproduktivni sustav <sup>69</sup>.

## 1.6.2 Barij (Ba)

### 1.6.2.1 Uvod



Za sada ne postoji definitivni dokaz da bi barij pripadao skupini esencijalnih elemenata.

Naglasak u dosadašnjim istraživanjima više je na strani toksičnosti nego esencijalnosti, iako postoje dokazi da su životinje koje su uzimale hranu osiromašenu barijem imale kraći životni vijek <sup>70</sup>.

Barij pripada alkalnim zemljinim

metalima, atomskog broja 56 i srednje atomske težine 137,33. Posjeduje sedam stabilnih izotopa: <sup>138</sup>Ba, <sup>137</sup>Ba, <sup>136</sup>Ba, <sup>135</sup>Ba, <sup>134</sup>Ba, <sup>130</sup>Ba i <sup>132</sup>Ba <sup>70</sup>.

### 1.6.2.2 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Najvažniji minerali koji sadrže Ba su barit ( $\text{BaSO}_4$ ) i viterit ( $\text{BaCO}_3$ ). Više od 90% ukupne proizvodnje barita otpada na aditive za ispiranje kod dubinskog bušenja, a samo 3% za proizvodnju barijevih soli <sup>71</sup>. Zbog svoje visoko apsorptivne sposobnosti za radijaciju, koristi se kao zaštitno sredstvo (barijev beton) u nukleranim reaktorima i radiološkim dijagnostičkim salama <sup>72</sup>. Barijev sulfat također se koristi kao pigment za boje i u proizvodnji papira. Između ostalog, barijev karbonat se koristi i kao otrov za štakore <sup>73</sup>.

### 1.6.2.3 Unos, apsorpcija i metabolizam

U ljudi, unos barija odvija se dominantno putem vode za piće uz velike razlike između zemljopisnih područja (prosječno od  $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  do  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Neke biljke, kao što su Brazilski oraščići (lat. *Bertholletia excelsa*), sadrže visoke koncentracije barija iako još nije u potpunosti jasno radi li se o specifičnom nakupljanju u biljnim vrstama ili je ovisno o sadržaju Ba u tlu <sup>74</sup>.

Sadržaj Ba u ljudima ovisan je o dobi. Primjerice, jetra (suha tvar) odraslih osoba sadrži od 4 do  $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Ba, dok je u djece ta koncentracija mnogo viša, oko  $144 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Većina barija koji se odlaže u tkiva nakuplja se u skeletu, prosječnih vrijednosti u rasponu od 16 do  $95 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suhe tvari. Vrlo visoka koncentracija pronađena je i u prostati djece <sup>70</sup>.

#### 1.6.2.4 Utjecaj na zdravlje

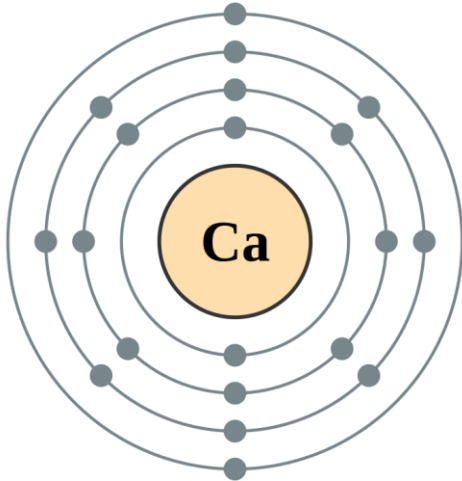
Nakon apsorpcije iz probavnog sustava, Ba se dominantno akumulira u koštanom tkivu, a izlučuje se pretežno fecesom <sup>70</sup>. Relativno se malo zna o učincima barija na živa bića. Neki od toksičnih učinaka topivih barijevih soli (karbonat, klorid) mogu se objasniti interakcijom barijevih iona sa kalijevim ionima. Zbog sličnih ionskih radijusa  $Ba^{2+}$  i  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$  može zaposjesti ionske kanale na površini stanice u trajanju  $10^4$ - $10^5$  puta duljem od  $K^+$  <sup>75</sup>. Na ovaj način izlazak kalija iz stanica je spriječen te se smanjuje izvanstanična koncentracija kalija, što u miokardu može dovesti do poremećaja srčanog ritma.

Otrovanje barijem može dovesti do, već navedene, hipokalemije. Nadalje, dovodi i do povišenja arterijskog tlaka, zatajenja bubrega i smrti zbog srčanog zatajenja <sup>70</sup>. Za razliku od gore navedenih spojeva, barijev sulfat može se koristiti bez rizika po zdravlje kao kontrastno sredstvo za radiološke pretrage zbog svoje niske topivosti što se odražava i niskom toksičnošću <sup>76</sup>.



### 1.6.3 Kalcij (Ca)

#### 1.6.3.1 Uvod



Iako je kalcij (Ca) prvi puta otkriven 1808.g. nezavisno od strane Sir Humphryja Davyja i Berzeliusa i Pontina, čisti metal prvi je puta proizveo Moissan 1898.g. Naziv dolazi od latinske riječi „calx“ što znači vapno. Kalcij čini 3,63% Zemljine kore i peti je element po redu zastupljenosti u okolišu kao i u ljudskom tijelu, a ujedno i najzastupljeniji metal u organizmu.

Zbog svoje reaktivnosti, u prirodi se nalazi samo u obliku spojeva; npr., brojne magmatske stijene, karbonat (vapnenac) i sulfat. Kalcij je presudan za život (živa bića), poglavito za održavanje arhitektonike bioloških struktura i metabolizma. Njegova strukturalna uloga izražena je u koraljima, životinjskim oklopima i, ovdje najvažnije, kostima kralježnjaka <sup>77</sup>.

Kao esencijalni mineral, kalcij igra važnu ulogu u regulaciji velikog broja molekularnih, staničnih i sustavnih procesa u organizmima kralježnjaka. Npr. potreban je za rast, razvoj i održavanje integriteta koštanog sustava, određuje preko svoje koncentracije u plazmi prag neuromišićnog podražaja, djeluje kao unutarstanični „drugi glasnik“ (engl. *second messenger*) u mnogim procesima kao što su stanična proliferacija i diferencijacija, oslobađanje neurotransmitera, mišićna kontrakcija i relaksacija i kontrola endokrinog i egzokrinog izlučivanja <sup>78,79</sup>.

Uz njegovu važnu biološku ulogu, kalcij se također koristi u brojnim industrijskim procesima kao npr. u metalurgiji. Kalcijeve soli (karbonat, sulfat, fosfat,

klorid, nitrat) sastavni su dijelovi kamene građe, gipsa, gnojiva i tvore bazu za mnoge druge tehnološke supstance.

#### 1.6.3.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Kalcij pripada, prema IUPAC-u, Grupi 2 Periodnog sustava elemenata (stari naziv grupa II2), atomskog je broja 20, specifične težine 40,078, i valencije +2 (lako oslobađa dva 4s elektrona). Kalcij se sastoji od šest prirodnih izotopa  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{46}\text{Ca}$  i  $^{48}\text{Ca}$ . Predominantni izotop je  $^{40}\text{Ca}$ , zastupljenošću od 96,947%. Postoji također osam radioaktivnih izotopa sa trajanjem poluživota od 173 ms ( $^{37}\text{Ca}$ ) do  $1,3 \times 10^5$  godina ( $^{41}\text{Ca}$ ); beta-emiter  $^{45}\text{Ca}$  ( $T_{1/2}=163$  dana) u uporabi je u proizvodnoj tehnologiji i nuklearnoj medicini.

Relativno je nestabilan metal na vlažnom zraku i brzo na površini stvara hidratni sloj. Sa vodom reagira spontano stvarajući  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  i plinoviti vodik; izgara u zraku, nakon konačnog raspada. Zbog svoje izrazite reaktivnosti, neki od spojeva – kao što su halogenidi i oksidi – prilikom stvaranja oslobađaju veliku toplinu <sup>77</sup>.

#### 1.6.3.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Kalcij se u većim količinama nalazi kao oksid u sedimentarnim, metamorfnim i magmatskim stijenama. Tla sadrže (prema geografskom području) vrlo različite količine kalcija; sadržaj kalcija može iznositi od 0,1 do >10% u obliku  $\text{CaO}$ , a isto tako unos kalcija u biljke ovisi o tlu gdje rastu. Uobičajene biljke za životinjsku prehranu sadrže  $1,2$  do  $17 \cdot 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  suhe tvari <sup>80</sup>.

Mlijeko i mliječni proizvodi, određeno voće (kiwi, naranče) i povrće (brokula, grašak) kao i rafinirana hrana (čokolada) nadilaze drugu hranu poput crvenog mesa, mesa peradi i tjestenine u svojoj vrijednosti u optimalnoj prehrani kalcijem <sup>80</sup>.

Kako bi organizmi osigurali ukupnu potrebnu količinu kalcija koja je gotovo ekvivalentna količini potrebnoj za izgradnju koštanog sustava (koji služi kao skladište kalcija), on se mora aktivno unositi iz okoliša, odnosno, iz hrane i pića kako bi se kompenzirao gubitak putem stolice i urina.

Kod kralježnjaka, 99% ukupnog kalcija u tijelu (1,0-1,3 kg u odraslih osoba <sup>77</sup>) vezan je u kostima gdje se prvenstveno nalazi u obliku kristalne fosfatne soli hidroksiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]. U manjoj mjeri, kalcij je u kostima vezan u obliku karbonata i citrata. Preostalih 1% ukupnog kalcija u tijelu neravnomjerno je raspoređeno između unutar- i izvanstaničnih tetkućina. Ukupni izvanstanični kalcij nalazi se u milimolarnim koncentracijama; tako je srednja vrijednosti koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u zdravih osoba  $2,5 \times 10^{-3}$  M, od čega je oko 50% u obliku „slobodnog“  $\text{Ca}^{2+}$ , 40% vezano je za proteine plazme (najviše albumin), a 10% vezano s ionima citrata i fosfata. Iako koncentracija unutarstaničnog kalcija iznosi oko  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  tjelesne težine, koncentracija „slobodnog“  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi manja je od  $10^{-6}$  M. Samo taj „slobodni“  $\text{Ca}^{2+}$ , tj. kalcijevi ioni koji nisu vezani za proteine, druge makromolekule ili membrane su oni koji sudjeluju u regulaciji staničnih procesa <sup>80</sup>.

#### 1.6.3.4 Unos, apsorpcija i metabolizam

Homeostaza kalcija zahtijeva održavanje dinamičkog ekvilibrija protoka kalcija u krvi, stanicama i izvanstaničnom prostoru koji sadrže mineralne ione u vrlo različitim koncentracijama. Stoga bi homeostatski kontrolni mehanizmi trebali modulirati protoke kalcija između različitih tjelesnih prostora na način koji bi omogućavao stvaranje i

održavanje velikih koncentracijskih gradijenata između koštanog tkiva, izvanstanične i unutarstanične tekućine, odnosno, citoplazme. Od velikog je značaja, dakle, stroga kontrola slobodnog plazmatskog  $\text{Ca}^{2+}$ , jer i najmanje odstupanje od normalne razine inducira velike promjene u unutarstaničnom slobodnom  $\text{Ca}^{2+}$  i u količini kalcija koji se odlaže u kosti izazivajući po zdravlje štetne događaje <sup>81</sup>.

Održavanje iste razine kalcija u krvi prvenstveno se ostvaruje kroz djelovanje brojnih hormona s utjecajem na protoke kalcija preko crijevnog i bubrežnog tubularnog epitela, te iz kosti. <sup>82</sup> Među značajnijima je stanično djelovanje steroidnog hormona 1,25-dihidroksivitamina  $\text{D}_3$  ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), biološki aktivnog metabolita vitamina  $\text{D}_3$  <sup>83</sup> i paratiroidnog hormona (PTH) <sup>84</sup>. Ostali hormoni koji mogu imati ulogu u održavanju homeostaze kalcija sustavnim djelovanjem uključuju tiroidne hormone <sup>85</sup>, glukokortikoide <sup>86</sup> i estrogene <sup>87</sup>. Također, uz spomenute, brojni biološki aktivni peptidi kao što je kalcitonin, citokini i faktori rasta kao i prostaglandini uključeni su u lokalnu regulaciju metabolizma kalcija, poglavito u koštanom tkivu <sup>88</sup>.

Važan doprinos regulaciji homeostaze dolazi od izvanstaničnog kalcijskog receptora (CaR). CaR je membranski receptor spregnut s G-proteinom putem kojeg su minimalna odstupanja  $\text{Ca}^{2+}$  prevedena u stanične funkcije uključujući i njihovu proliferativnu aktivnost. CaR se nalazi na površini stanica paratiroidnih žlijezda i stanica drugih organskih sustava povezanih sa regulacijom metabolizma kalcija: kosti, bubrega i crijeva <sup>89</sup>.

Transport kalcija u crijevnom i bubrežnom epitelu provodi se transcelularno i paracelularno. Prolazak putem polariziranih stanica je vektorski proces u više stupnjeva koji uključuje: (i) ulazak kalcija kroz četkastu membranu dvama tipovima kanala; (ii) unutarstanična difuzija (potpomognuta kalbindinom, proteinom koji veže kalcij, ovisnim o vitaminu D); (iii) izlazak u organizam kroz bazolateralni dio stanice putem aktivnih transportnih mehanizama <sup>90</sup>.

U usporedbi sa strogo reguliranim aktivnim transcelularnim transportom, relativno su se malo istraživali molekularni mehanizmi koji su sastavni dio paracelularne spojnice (engl. *shunta*) u crijevnom i bubrežnom epitelu koji je odgovoran za većinu transepitelnog prijenosa  $\text{Ca}^{2+}$ . Relativni doprinos opisanog puta ukupnoj apsorpciji kalcija pokazuje velike varijacije (između 20 i 100%) ovisno o dobi, anatomskom smještaju, D-vitaminskom statusu organizma i luminalnoj koncentraciji kalcija<sup>91</sup>. S dobi crijevna apsorpcija kalcija pada što rezultira povišenim vrijednostima PTH i povećanom koštanom obrtaju povezanom s dobi. Smatra se da je navedeno rezultat smanjenih vrijednosti cirkulirajućeg vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) kao i crijevne rezistencije na njegov utjecaj<sup>92</sup>.

Iako je debelo crijevo sposobno apsorbirati kalcij do određene mjere, u ljudi i životinjskih vrsta većina (70 - 90%) unesenog kalcija apsorbira se u tankom crijevu<sup>93,94</sup>. Ograničavajući čimbenik je dostupnost za transepitelnu apsorpciju koja je niska u prisustvu prehrambenih tvari koje stvaraju komplekse kao što su oksalati i fitati<sup>95</sup>.

Apsorpcija kalcija u ljudi iznosi između 20 i 70%<sup>96</sup>, a opada s godinama starosti. Adaptacija crijevne apsorpcije kalcija, ovisno o količini unesenog kalcija, regulirana je endokrino vitaminom D. Niska razina Ca stimulira bubrežnu sintezu vitamina D, koji nadalje vodi povećanju apsorpcije kalcija iz crijevnog lumena<sup>90,93</sup>. Ovim je mehanizmom frakcionirana apsorpcija kalcija u crijevima prilagođena stvarnim potrebama organizma.

Kako je za održanje koštanog integriteta kralježnjaka potreban kalcij iz okoline, dio koji se iz cirkulacije izlučuje glomerularnom filtracijom mora biti reapsorbiran tijekom svojeg prolaska kroz tubularni epitel. Većina filtriranog kalcija (~70%) reapsorbira se u proksimalnom tubulu, uglavnom paracelularnim putem, dok se 20% reapsorbira u Henleovoj petlji gdje je dominantan transcelularni put (pod utjecajem PTH). Reapsorpcija oko 8% filtriranog kalcija događa se u distalnom zavijenom tubulu

i uključuje transcelularni transport kojega aktivira PTH i vitamin D <sup>97</sup>. Neovisno o PTH i vitaminu D, izvanstanični kalcijски receptor (CaR) kontrolira bubrežnu reapsorpciju kalcija prvenstveno inhibirajući tubularnu reapsorpciju kada koncentracija peritubularnog Ca<sup>2+</sup> poraste <sup>89</sup>.

Temeljeno na činjenici da je 99% kalcija sadržano u kostima, zaključuje se da su potrebe za kalcijem gotovo u potpunosti određene potrebama koštanog sustava. Dakle, u zdravog organizma, jedina varijabla koja bi mogla utjecati na homeostazu kalcija je apsolutna količina istog apsorbirana u crijevima. Drugim riječima, održavanje normalne razine izvanstaničnog kalcija u slučaju smanjenog unosa ili malapsorpcije moguće je samo na račun kalcija u kostima <sup>81</sup>.

Smatra se da je unos kalcija na donjoj granici dnevno preporučene količine (Recommended Daily Allowance, RDA) potreban da zadovolji potrebe koštanog sustava i održavanje koštanog zdravlja kroz život. Različite RDA određene su za različite dobne skupine <sup>98</sup>.

Trudnoća i dojenje dva su kritična perioda kada fetus i novorođenče osiguravaju potrebne količine kalcija za kosti isključivo iz majčinskih izvora, tj. kosti. Organizam, također, osobito treba kalcij za vrijeme koštanog rasta i razvoja za postizanje optimalne vršne mase kosti <sup>99</sup> i da minimalizira rizik od osteoporotičnih fraktura u kasnijim godinama <sup>100</sup>.

Preporučene dnevne doze kalcija su 1000 mg za ljude oba spola od 19 do 50 godina starosti. Za djecu i adolescente (9 – 18 godina) RDA iznosi 1300 mg. Iste vrijednosti preporučene su za te dobne skupine neovisno o laktaciji odnosno trudnoći. Za osobe starije od 50 g. RDA se povećava na 1200 mg kalcija <sup>98</sup>.

Mnoge žene iskuse značajne gubitke kalcija zbog ubrzanog koštanog obrtaja nakon menopauze. Godišnje opadanje koštane mase od 3-5% je uobičajeno u prvim godinama menopauze, dok su godišnji gubici manji od 1% nakon 65. godine <sup>101</sup>. Da bi

se održala ravnoteža, unos kalcija mora se povećati na 1500 mg na dan <sup>98</sup>. Osim menopauze uzrok gubitka kalcija kod starijih osoba vjerojatno je i malapsorpcija <sup>102</sup>.

Nadalje, ravnoteža kalcija ovisi i o fizičkoj aktivnosti. Tako imobilizacija kroz kraći vremenski period (npr. 1-2 tjedna provedena u krevetu) dovodi do mobilizacije kalcija iz kosti i posljedičnog gubitka <sup>81</sup>.

Malapsorpcija kalcija može biti i posljedica hipovitaminoze D koja se viđa kod gastrointestinalnih, jetrenih i bubrežnih bolesti <sup>103</sup> kao i kod nekih endokrinih poremećaja poput hipertireoidizma <sup>104</sup>. Alkoholizam <sup>105</sup> i dugoročna terapija nekim lijekovima kao što su glukokortikoidi ili antikonvulzivi <sup>106</sup> također imaju negativan učinak na crijevnu apsorpciju kalcija.

#### 1.6.3.5 Utjecaj na zdravlje

Malnutricija i kronične bolesti. Dok se nedostatak kalcija smatra važnim čimbenikom u uobičajenim bolestima kao što su osteoporoza i hipertenzija, moguće je da igra ulogu i u razvoju drugih bolesti kao što su maligniteti dojke, prostate i debelog crijeva.

Osteoporoza. Involucijska (primarna) osteoporoza manifestacija je metaboličke bolesti kosti gdje je količina mineralizirnog koštanog matriksa u oboljelih pacijenata smanjena na razinu ispod normale za zdravu populaciju iste dobi i spola. Bolest je svakako multifaktorijalna, a čimbenici kao što su ženski spol, mala tjelesna masa, fizička neaktivnost, starija životna dob, pušenje cigareta, konzumacija prekomjernih količina alkohola i obiteljska sklonost mogu uzrokovati poremećaj procesa koštanog remodeliranja <sup>107</sup>.

Iako kalcij ima pozitivan učinak na koštanu masu, mehanizam kojim izvanstanični Ca modulira koštanu formaciju dugo je vremena bio nepoznanica. Leis et

al. <sup>108</sup> bili su prvi koji su opisali funkciju na  $\text{Ca}^{2+}$  osjetljiv mehanizam na MC3T3-E1 osteoblastima slične stanice. Klonalne linije osteoblastičnih stanica posjeduju CaR koji su slični, ako ne i identični, CaR paratiroidnih žlijezda. Aktivacija CaR porastom razine  $\text{Ca}^{2+}$  povećava proliferativnu aktivnost osteoblasta čime se može objasniti pozitivan učinak suplementacije kalcijem na koštanu masu <sup>109</sup>.

Hipertenzija. Nekoliko epidemioloških, eksperimentalnih i kliničkih studija ukazuje da bi primarna hipertenzija mogla biti povezana sa nedostatnim unosom kalcija, no zaključci su nedosljedni. Sustavna revizija učinaka suplementacije kalcijem našla je tek slabu povezanost sa liječenjem hipertenzije poglavito zbog različite metodologije istraživanja <sup>110</sup>.

Kalcij i maligne bolesti. Rezultati nekih istraživanja ukazuju na povezanost višeg unosa kalcija i smanjenja rizika za oboljenje od karcinoma debelog crijeva, dok je povezanost kalcija i karcinoma dojke i jajnika nejasna. Nasuprot tome, postoje indicije da bi povećani unos kalcija mogao povećavati i rizik od karcinoma prostate. U ovom trenutku National Cancer Institute (NCI) ne preporuča preparate kalcija za smanjenje rizika od malignih bolesti <sup>111</sup>.

Manjak kalcija. Hipokalcemija je klinički definirana kada se razina kalcija u serumu spusti ispod  $2,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  odnosno razina ioniziranog kalcija ispod  $1,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  <sup>112</sup>. Rezultira prvenstveno zbog nekih bolesti ili terapijskih postupaka kao što su zatajenje bubrega, gastrektomija i korištenje nekih lijekova (diuretici). Simptomi uključuju slabljenje osjeta, trnce, grčeve muskulature, konvulzije, letargiju, gubitak apetita i aritmije. Ako se ne liječi, hipokalcemija je potencijalno smrtonosna <sup>113</sup>.

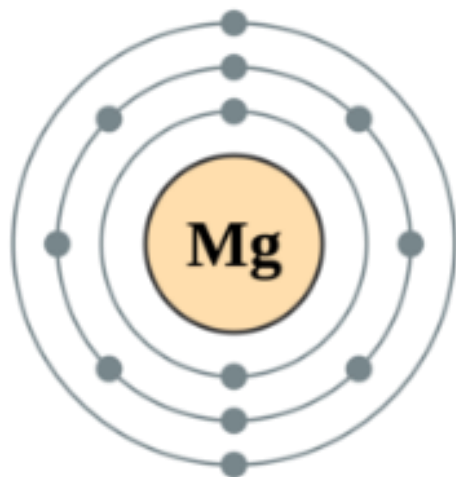
Višak kalcija. Hiperkalcemija je stanje kada je razina kalcija u serumu iznad  $2,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  odnosno  $1,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ioniziranog <sup>112</sup>. Dugoročno takvo stanje može izazvati bubrežno zatajenje, kalcifikaciju vaskulature i mekih tkiva, hiperkalciuriju i bubrežne kamence. Najčešće se povezuje sa hiperparatireoidizmom i malignim bolestima.



Hiperkalcemična kriza akutno je stanje kod koje vrijednosti Ca u serumu prelaze  $3,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  i manifestira se oligurijom do anurije, aritmijom, somnolencijom ili komom <sup>113</sup>.

## 1.6.4 Magnezij (Mg)

### 1.6.4.1 Uvod



Magnezij je osmi element po zastupljenosti na Zemlji i ukupno čini 2% Zemljine kore. Zbog svoje reaktivnosti, ne nalazi se u prirodi kao metal već u obliku različitih soli i u ionskom obliku u vodi. Iako ga je prvi izolirao Sir Humphry Davy 1808.g., njegova uporaba u medicinske svrhe u obliku mineralnih voda datira u davna vremena <sup>114</sup>. Esencijalna uloga

magnezija u životinja prvi je puta opisana 1926.g. <sup>115</sup>, a tijekom 1950.-ih godina, manjak magnezija povezan je sa brojnim patološkim stanjima u ljudi <sup>116</sup>. Nakon toga sve se više pažnje posvećuje važnosti Mg u fiziološkim procesima i medicini.

Cjelokupni raspon njegovih funkcija i regulacija u živim organizmima otkriva se tijekom posljednjih nekoliko desetljeća kako su nove analitičke metode postale dostupne <sup>114</sup>.

### 1.6.4.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Magnezij pripada grupi II treće periode Periodnog sustava elemenata; atomske težine 24,312, atomskog broja 12 i valencije +2. U prirodi se sastoji od tri izotopa <sup>24</sup>Mg

(79%),  $^{25}\text{Mg}$  (10%) i  $^{26}\text{Mg}$  (11%)<sup>95</sup>. Biološki sustavi koriste ga u obliku iona ( $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>117</sup>. U usporedbi s kalcijevim ionom,  $\text{Mg}^{2+}$  je manji i lakše privlači molekule vode tvoreći sa svojih šest slobodnih kovalentnih veza relativno veliku hidracijsku ljusku koja onemogućuje prolasku kroz uske kanale u biološkim membranama.

#### 1.6.4.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Magnezij u tlu čini 5-30% ukupnog kationskog kapaciteta, a manjak u biljkama nastaje kada količina padne ispod 5% što se događa u područjima koja obiluju kiselim kišama<sup>114</sup>. Prirodno se nalazi u mnogim namirnicama, kao dodatak drugim prehranbenim proizvodima, dostupan je kao dodatak prehrani i u nekim lijekovima (npr. antacidi i laksativi)<sup>118</sup>.

Odrastao čovjek sadrži oko 1 mol (24 g) magnezija, s time da ga se u kostima nalazi 60-65%, mišićima 27%, u ostalim tkivima 6-7% i <1% izvan stanica. U serumu 55% Mg je u slobodnoj formi, 13% u spoju sa citratom, fosfatom i drugim spojevima, a 32% vezan na albumin<sup>114,119</sup>. Normalne vrijednosti serumskog albumina kreću se između 750 i 950  $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$  (1,8 - 2,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), a hipomagnezemija je određena koncentracijom manjom od 750  $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$  (18  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) u serumu<sup>120</sup>. Homeostaza je najvećim djelom pod kontrolom bubrega što u normalnim okolnostima iznosi oko 120 mg Mg u urinu na dan. Koncentracija Mg u urinu pada kad mu je status u organizmu nizak<sup>121</sup>.

Procjena statusa Mg u organizmu nije jednostavna zbog toga što se većina nalazi unutar stanica ili u kostima<sup>118</sup>. Najčešće korištena i lako dostupna metoda je mjerenje koncentracije u serumu, iako serumske vrijednosti ne koreliraju sa ukupnom količinom Mg u organizmu ili koncentracijama u pojedinim tkivima<sup>122</sup>. Ostale metode uključuju mjerenje koncentracije u eritrocitima, slini i urinu, mjerenje ioniziranog Mg u

krvi, plazmi ili serumu i provođenje tzv. *Mg-loading (tolerance)* testa. Do sada niti jedna od navedenih metoda nije se pokazala u potpunosti zadovoljavajućom <sup>123</sup>.

Preporučeni dnevni unos magnezija (*Recommended Dietary Allowance, RDA*) povećava se s godinama; za djecu od 4 do 8 godina iznosi 130 mg, od 9 do 13 godina 240 mg, a od 14 do 18 godina za muškarce 410 dok za žene 360 mg na dan. Od 19 do 30 godina muškarcima je potrebno 400 mg Mg na dan, a ženama 310 mg uz povećane potrebe tijekom trudnoće. Iznad 31 godine muškarci trebaju uzimati 420 mg, a žene 320 mg Mg na dan <sup>124</sup>.

U prirodi Mg je prisutan u mnogim prehrambenim namirnicima biljnog i životinjskog podrijetla te pićima. Najbogatiji izvor su zeleno povrće kao što je špinat, pa citrusi, orašasti plodovi i žitarice <sup>118</sup>. Od ukupnog unosa oko 30-40% Mg u prehrani se u tijelu apsorbira <sup>121</sup>.

#### 1.6.4.4 Metabolizam i utjecaj na zdravlje

Magnezij je kofaktor u više od 300 enzimatskih sustava koji reguliraju različite biološke reakcije uključujući sintezu proteina, funkciju mišića i živaca, kontrolu razine glukoze i kontrolu krvnog pritiska <sup>118,121</sup>. Potreban je za proizvodnju energije, oksidativnu fosforilaciju i glikolizu. Sudjeluje u strukturalnom razvoju kosti i nužan je za sintezu DNA, RNA i antioksidansa glutaciona; također ima ulogu u aktivnom transportu kalcijevih i kalijevih iona kroz staničnu membranu <sup>118</sup>.

Hipertenzija i ateroskleroza. Studije su do sada pokazale da suplementacija magnezijem tek u manjoj mjeri snižava krvni tlak. Meta-analiza kliničkih ispitivanja dokazala je da suplementacija kroz 3-26 tjedana u pacijenata koji boluju od hipertenzije rezultira redukcijom dijastoličkog krvnog tlaka za 2-3 mmHg <sup>125</sup> i 3-4

mmHg sistoličkog tlaka <sup>126</sup>. Rezultati su bili nešto izraženiji kada bi količina Mg bila iznad 370 mg na dan.

Dokazano je meta-analizom prospektivnih studija da su više vrijednosti serumskog magnezija povezane sa smanjenim rizikom za kardiovaskularnih bolesti, a više vrijednosti Mg u prehrani (do 250 mg na dan) sa smanjenim rizikom za ishemijsku bolest srca <sup>127</sup>. Više vrijednosti unosa Mg mogu smanjiti rizik i za cerebrovaskularni inzult (CVI). Meta-analizom 7 prospektivnih ispitiavnja na ukupnoj populaciji od više od 240 tisuća ispitanika, nađeno je da dodatak od 100 mg Mg na dan smanjuje rizik za CVI za 8%, više ishemijskog nego hemoragijskog <sup>128</sup>.

Dijabetes tipa 2. Dijete bogate magnezijem povezane su sa smanjenim rizikom za dijabetes, moguće posljedično važnoj ulozi Mg u metabolizmu glukoze <sup>129,130</sup>, a hipomagnezemija može pogoršati rezistenciju na inzulin <sup>131</sup>. Dijabetes dovodi do povećanih gubitaka magnezija urinom, a posljedični manjak magnezija može smanjiti sekreciju i djelovanje inzulina <sup>118</sup>. Unatoč navedenom, još uvijek nema dovoljno dokaza da rutinsko uzimanja dodatnog Mg u prehrani povećava kontrolu glikemije u ljudi oboljelih od dijabetesa <sup>132</sup>.

Osteoporoza. Magnezij sudjeluje u stvaranju kosti i utječe na aktivnost osteoblasta i osteoklasta <sup>133</sup>. Također utječe na koncentraciju kako paratireoidnog hormona tako i aktivne forme vitamina D, glavnih regulatora koštane homeostaze. Nekoliko studija našlo je pozitivnu korelaciju između unosa magnezija i mineralne gustoće kosti u muškaraca i žena <sup>134</sup>. Druga istraživanja su dokazala da žene sa osteoporozom imaju niže vrijednosti Mg u serumu nego žene s osteopenijom odnosno one koje ne boluju ni od osteoporoze niti od osteopenije <sup>135</sup>. Ovi rezultati ukazuju da bi manjak magnezija mogao biti rizičan čimbenik za osteoporozu <sup>133</sup>.

Višak magnezija. Previše Mg u hrani ne predstavlja rizik za zdravlje u zdravih pojedinaca zbog toga što bubrezi eliminiraju višak urinom <sup>136</sup>. Unatoč tome, visoke

doze magnezija iz prehrambenih nadomjestaka ili lijekova često rezultiraju proljevom koji može biti praćen mučninom i abdominalnim kolikama <sup>134</sup>. Laksativni učinci magnezijevih soli posljedica su osmotske aktivnosti neapsorbiranih soli u tankom i debelom crijevu i stimulaciji motiliteta probavne cijevi <sup>137</sup>. Toksičnost se manifestira kada su serumske koncentracije iznad  $1740\text{-}2610\text{ mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $423\text{-}636\cdot 10^3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) i manifestira se hipotenzijom, mučninom, povraćanjem, crvenilom lica, retencijom urina, ileusom, i letargijom prije nego progredira u slabost mišića, oslabljenim disanjem, teškom hipotenzijom, aritmijom i kardijalnim arestom. Rizik za hipermagnezemijum povećan je kod poremećaja funkcije bubrega zbog nemogućnosti izlučivanja viška Mg <sup>138</sup>.

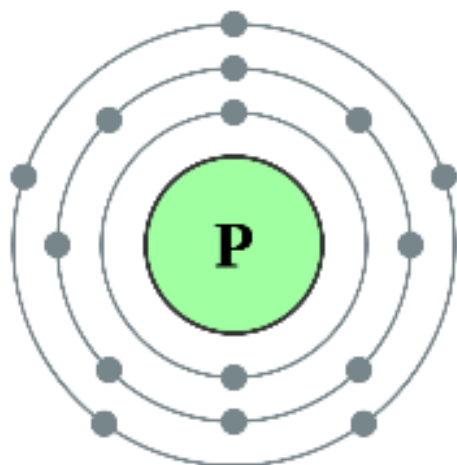
Manjak magnezija. Simptomatski manjak Mg zbog niskog unosa u inače zdravih osoba je rijedak zbog toga što bubrezi ograničavaju pretjerano izlučivanje <sup>118</sup>. Smanjena koncentracija Mg događa se kada se unos smanji ispod RDA. Skupine koje su pod rizikom uključuju ljude s bolestima probavnog sustava kao što je kronični proljev i malapsorpcija masti kao rezultat Crohnove bolesti, celijačne bolesti ili regionalnog enteritisa <sup>121</sup>. Resekcija ili premoštenje (engl. *bypass*) tankog crijeva, pogotovo ileuma, tipično dovode do malapsorpcije i gubitka magnezija <sup>121</sup>. Nadalje, manjak i povećano izlučivanje magnezija događa se u ljudi sa šećernom bolesti tipa 2. <sup>138</sup> Čini se da je gubitak Mg posljedica više koncentracije glukoze u bubregu što povećava diurezu <sup>121</sup>.

Rani znakovi nedostatka su gubitak apetita, mučnina, povraćanje, zamor i malaksalost. Kako se manjak produbljuje, dolazi do parestezija, grčeva mišićne mase, promjene stanja svijesti, poremećaja srčanog ritma i spazma koronarnih arterija <sup>121,124</sup>. Navedeni simptomi posljedica su u najvećoj mjeri promjenama u izvanstaničnim koncentracijama Mg zbog neposrednih učinaka magnezija i interakcija Mg i Ca <sup>114</sup>. Teška hipomagnezemija može rezultirati i hipokalcemijom ili hipokalemijom zbog

poremećaja homeostaze minerala <sup>121</sup>. U pojedinim medicinskim školama magnezij sulfat (MgSO<sub>4</sub>) najčešće je korišten agens za liječenje eklampsije i profilaksu eklampsije kod pacijenata s teškom pre-eklampzijom <sup>139</sup>.

## 1.6.5 Fosfor (P)

### 1.6.5.1 Uvod



Fosfor kao element u prirodi postoji u dvije forme – kao bijeli te kao crveni fosfor, no zbog svoje reaktivnosti nikada se na Zemlji ne nalazi u elementarnom obliku. Otkrio ga je Hennig Brandt 1669.g., a kako nakon izlaganja kisiku emitira slabu svjetlost, nazvan je po grčkoj riječi *phosphoros* u značenju „onaj koji nosi svjetlost“ <sup>140</sup>. Fosfor je esencijalan element sa

mного uloga u ljudskom organizmu od kojih je najznačajnija stvaranje ADP ↔ ATP <sup>141</sup>.

### 1.6.5.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Pripada grupi 15 i trećoj periodi Periodnog sustava elemenata, atomskog broja 15 i relativne atomske mase 30,974 <sup>140</sup>. Poznata su 23 izotopa fosfora što uključuje varijante od <sup>24</sup>P do <sup>46</sup>P. Dva radioaktivna izotopa imaju poluvremena života pogodna za biološka znanstvena ispitivanja. To su <sup>32</sup>P koji se rutinski koristi u laboratorijima za

produkciju označenih proba DNA i RNA te  $^{33}\text{P}$  koji se koristi za sekvenciranje DNA

142.

### 1.6.5.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Fosfor se u prirodi najčešće nalazi u svojoj pentavalentnoj formi u kombinaciji s kisikom, kao  $\text{PO}_4^{3-}$ . Esencijalan je sastavni dio svih protoplazmi i njegova je koncentracija jednaka kod većine biljaka i životinja <sup>143</sup>.

U ljudskom tijelu nalazi se otprilike 600 grama fosfora i čini od 0,65 do 1,1% mase tijela <sup>144,145</sup>. Otprilike 85% nalazi se u kostima, a 15% unutar stanica – kao slobodni anion te kao dio brojnih organofosfornih spojeva <sup>113,145</sup>, a manje od 1% ukupnih fosfata nalazi se izvan stanica <sup>146</sup>. Koncentracija fosfata u serumu održava se intestinalnom apsorpcijom, bubrežnim transportom, izmjenom sa kostima i unutarstaničnom tekućinom <sup>113</sup>. U zdravih odraslih osoba nekoliko stotina miligrama fosfata dnevno se apsorbira u crijevima i gotovo ista količina se izlučuje urinom tako održavajući ravnotežu <sup>147</sup>. U stanicama i izvanstaničnoj tekućini postoji uglavnom kao  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i  $\text{NaHPO}_4^-$  te nekih 10% kao  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Upravo tu staničnu „mješavinu“ nazivamo fosfatima. U serumu je oko 12% fosfata vezano za proteine <sup>113</sup>. Normalne serumske vrijednosti anorganskog fosfora u serumu iznose  $3 - 4,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  <sup>112</sup>, a prosječne dnevne potrebe u odrasle osobe (oba spola) su 580 mg <sup>143</sup>.

Fosfati su široko dostupni u ljudskoj prehrani i učinkovito se apsorbiraju u tankom crijevu (65%) i bez prisustva vitamina D. Dodatak vitamina D podiže razinu apsorpcije na 85-90% na račun aktivnog transporta <sup>94</sup>. U proksimalnim tubulima bubrega 80-90% fosfata filtriranih glomerulima, reapsorbirano je istosmjernim transportom  $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{2-}$  <sup>148</sup>. Ima dokaza koji govore u prilog tome da postoji cirkadijani ritam serumskih fosfata <sup>149,150</sup>. Koncentracijski maksimum javlja se između 2 i 4 sata

iza ponoći, dok se najniža koncentracija nađe između 8 i 10 sati ujutro što vjerojatno nastaje zbog perioda gladovanja <sup>150</sup>. Mehanizam dnevnih varijacija fosfata ostaje nepoznanica s obzirom da ga promjene u cirkadijanom ritmu PTH, hormona rasta, vitamina D ili FGF23 ne mogu u potpunosti objasniti <sup>141</sup>.

#### 1.6.5.4 Metabolizam

Metabolizam fosfata hormonski je reguliran paratireoidnim hormonom (PTH), 1,25-dihidroksivitaminom D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) i čimbenikom rasta fibroblasta 23 (FGF23) <sup>141</sup>, a PTH i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  smatraju se kalciotropnim hormonima. Koncentracija ioniziranog kalcija određuje PTH sekreciju u osoba sa normalnom funkcijom bubrega putem receptora osjetljivog na Ca <sup>151</sup>. PTH nadalje, potiče sintezu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  i FGF23, a postoji i negativna povratna sprega između fosfata u serumu i sinteze PTH, iako nije jasno koliko je ona značajna u osoba sa normalnom bubrežnom funkcijom <sup>152</sup>. Crijevna apsorpcija posredovana je transcelularnim i paracelularnim putevima.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  povećava transcelularnu crijevnu apsorpciju povećavajući ekspresiju  $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{2-}$  kotransportera tipa 2b <sup>153</sup>, a fosfati smanjuju produkciju  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  <sup>154</sup>.

#### 1.6.5.5 Utjecaj na zdravlje

Fosfati imaju više uloga u organizmu. Važni su za pravilnu mineralizaciju kosti kao dio kristala hidroksiapatita. Nadalje, nekoliko fosforiliranih proteina kao što su osteopontin i dentin matriks protein 1 (DMP1) reguliraju koštanu mineralizaciju <sup>147,155</sup>. Fosfati su također sastavni dijelovi biomembrana i nukleinskih kiselina. Mnogi fosforilirani metaboliti kao što su adenzin trifosfat (ATP), 2,3-difosfoglicerat (2,3-BGP), glukoza-6-fosfat (G6P) i fosforilirani proteini potrebni su za različite funkcije svih



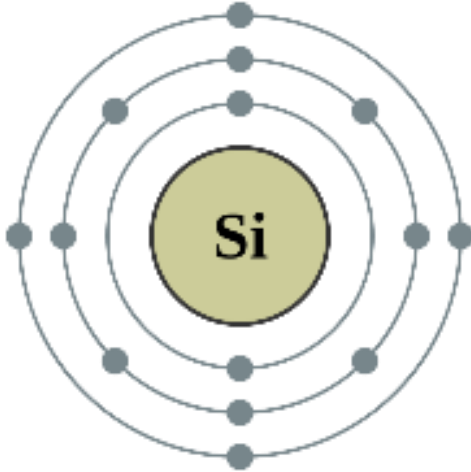
stanica u smislu energetskog metabolizma, diferencijacije, proliferacije i specifične funkcije diferenciranih stanica. Da bi se realizirale samo neke od navedenih funkcija, potrebno je da se koncentracija izvanstaničnog fosfata održava u određenom rasponu<sup>141</sup>. Na metabolizam utječu i drugi minerali, pa je tako bubrežna reapsorpcija poremećena hipokalcemijom, hipomagnezijom i teškom hipofosfatemijom. Izlučivanje fosfata potpomognuto je povećanjem izvanstaničnog volumena, a smanjeno dehidracijom<sup>113</sup>.

Manjak fosfata (hipofosfatemija) nastaje putem jednog ili više od tri moguća primarna mehanizma: (i) neadekvatne crijevne apsorpcije, (ii) povećanog bubrežnog izlučivanja ili (iii) brze redistribucije fosfata iz izvanstanične tekućine u kosti ili meka tkiva<sup>94</sup>. Može uzrokovati tegobe kao slabost mišića, rabdomiolizu, poremećaj svijesti i rahitis odnosno osteomalaciju<sup>156</sup>.

Nasuprot tome, višak fosfata (hiperfosfatemija) rezultira ektopičnom kalcifikacijom. Iako se ne zna u potpunosti kako su unutarstanični fosfati regulirani, čini se da su djelomično pod utjecajem izvanstaničnih s obzirom da hipofosfatemija inducira tkivnu hipoksiju snižavajući razinu 2,3-BGP u eritrocitima<sup>156</sup>. Hiperfosfatemija je definirana serumskom vrijednosti od više ili jednako  $5,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a obično je rezultat poremećaja glomerularne filtracije, hipoparatiroidizma ili povećanom izlaska iz kosti ili crijeva u izvanstaničnu tekućinu. Kada se velike količine fosfata nađu u izvanstaničnom prostoru, može se javiti hiperfosfatemija unatoč urednoj bubrežnoj funkciji. Primjeri za to su pretjerana terapija fosfatima, prevelike količine laksativa koji sadrže fosfate, opsežne nekroze tkiva (nagnječnja, rabdomioliza, hipertermija, citotostatska terapija)<sup>113</sup>.

## 1.6.6 Silicij (Si)

### 1.6.6.1 Uvod



Silicij (Si) je nemetal atomske mase 28 i drugi je najčešći element u tragu u Zemljinoj kori <sup>157</sup>.

Na mogućnost da ima esencijalnu uloga u metabolizmu kosti i zglobova ukazano je na pokusima sa životinjama <sup>158,159</sup>. Od tada istraživanja kroz posljednjih 30 godina dodatno su pridonijela mišljenju da je unos silicija hranom važan i koristan za formiranje i zdravlje

kosti. Način unosa i metabolizam ovog elementa tek su nedavno otkriveni <sup>160</sup>.

### 1.6.6.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Pripada grupi 14 i trećoj periodi Periodnog sustava elemenata, a otkrio ga je Jöns Jacob Berzelius 1824.g. U prirodi se nalazi u krutom stanju <sup>161</sup>. Rijetko se nalazi u elementalnoj formi zbog izraženog afiniteta prema kisiku s kojim tvori silikate. Silikati (najčešći su kvarc i plagioklasi) čine ukupno 92% svih minerala <sup>162</sup>.

### 1.6.6.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Ljudi su izloženi brojnim izvorima silicija uključujući prašinu, lijekove, kozmetiku i medicinske implantate, no glavni izvor za većinu je hrana <sup>160</sup>. Dnevni unos Si je 20 – 50 mg na dan što je  $\geq 2$  puta više nego željezo i cink <sup>163</sup>, a jedan od glavnih izvora je

pivo tako da je prosječan dnevni unos veći kod muškaraca nego žena na račun većeg unosa piva <sup>164,165</sup>.

U vodi za piće, silicij dolazi iz prolaska kroz stijene i tlo, a kako se razičiti minerali otapaju različitim brzinama, koncentracija Si u vodi ovisi o lokalnoj geološkoj slici <sup>160</sup>. Pitka voda pruža najbrže dostupan biološki izvor silicija s obzirom da je prisutan u obliku  $\text{Si(OH)}_4$  tako da unos pićem čini više od 20% ukupnog dnevnog unosa Si <sup>166</sup>.

Silicij u hrani dolazi iz biljaka. Biljke apsorbiraju i ugrađuju Si iz tla, a u nekima je esencijalan kao strukturna komponenta. Takvi „akumulatori silicija“ većinom su jednosupnice što uključuje žitarice, trave i ljekovito bilje, a sadrže 10-20 puta više silicija od dvosupnica <sup>165,167</sup>.

#### 1.6.6.4 Unos, apsorpcija i metabolizam

Gastrointestinalna apsorpcija. Glavni put unosa Si je probavni sustav. Izlučivanje urinom dobar je pokazatelj apsorpcije i korelira sa unosom putem hrane <sup>164,168</sup>. Unatoč tome, crijevna aporpcija, metabolizam i izlučivanje još su uvijek relativno nepoznati <sup>160</sup>. U prosjeku se 41% unesenog silicija apsorbira iz hrane tako da se i sadržaj Si u hrani može koristiti za procjenu unosa <sup>164</sup>, no prije apsorpcije potrebno je da se fitosilikati razgrade na manje vodotopive spojeve kao što su ortosilikati <sup>164,169</sup>. Ortosilikatna kiselina najčešći je spoj prisutan u vodi za piće i drugim napitcima uključujući pivo. Lako se apsorbira i izlučuje i čini oko 50% unosa <sup>164,166,170</sup>.

Metabolizam i izlučivanje. Apsorbirani silicij prolazi kroz crijevnu mukozu i dolazi u krv. Ne zna se ostaje li dio Si u stanicama mukoze kao u slučaju nekih kationa. Ne veže se za proteine plazme ili sa njima tvori tek vrlo slabe, lako disocirajuće veze <sup>171</sup>.

Prisutan je u spojevima neutralne ortosilikatne kiseline koji lako ulaze u eritrocite i druga tkiva<sup>172</sup> ili kao silikati (npr. magnezijev silikat)<sup>171</sup>.

Većina apsorbiranog silicija izlučuje se bubrezima. Štoviše, bubrežna funkcija važna je determinanta koncentracije Si u plazmi. Tako je više Si u plazmi ljudi sa poremećenom funkcijom bubrega kao što su pacijenti s uremijom<sup>171,173,174</sup>. U urinu koncentracija Si korelira s razinom kalcija i magnezija što bi značilo da se vjerojatno nalazi u obliku kalcijevih, odnosno, magnezijevih silikata<sup>174</sup>. Kako se Si ne veže za proteine plazme, u potpunosti se izlučuje glomerularnom filtracijom<sup>171</sup> uz minimalnu tubularnu reapsorpciju<sup>174</sup> tako da je većina Si eliminirana iz organizma kroz 4-8 sati nakon unosa hranom<sup>164,169,160</sup>.

Raspodjela u tkivima. Manji dio silicija unesenog u organizam zadržava se i odlaže u svim tkivima uključujući mozak, a ukupna količina Si u tijelu iznosi nekoliko grama.<sup>171,175</sup> Koncentracije u tkivima variraju. U štakora najviše koncentracije nalaze se u kostima i vezivnim tkivima, a 10-20 puta manje u mekim tkivima<sup>160</sup>. Slična distribucija za očekivati je i u ljudskom tijelu, iako to do sada nije istraženo, no predloženo je da je Si integriran u vezivnim tkivima gdje ima važnu strukturnu ulogu<sup>176</sup>.

#### 1.6.6.5 Utjecaj na zdravlje

Pozitivni učinci na kosti. Eksperimenti na životinjama ukazuju na moguću esencijalnu ulogu silicija za normalan rast i razvoj u viših životinja, uključujući ljude, primarno u razvoju kosti i vezivnih tkiva<sup>159, 177,178</sup>. Dva presječna (engl. *cross-sectional*) istraživanja su pokazala da je unos silicija povezan sa povećanom gustoćom kosti. U kohorti Framingham Offspring zaključeno je da je viši unos silicija značajno povezan sa povećanjem gustoće kosti u području kuka kod muškaraca i

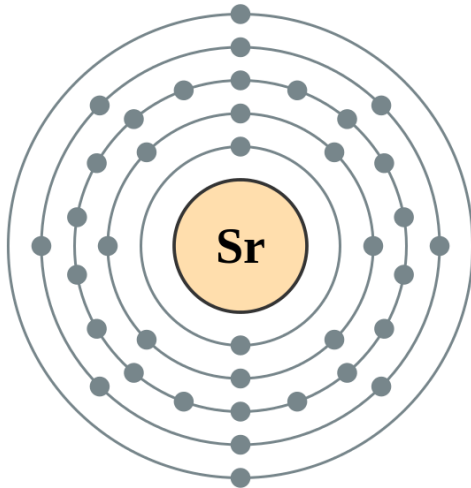
premenopauzalnih žena, ali ne i postmenopauzalnih <sup>179</sup> što je kasnije ponovljeno sa istim rezultatima koristeći kohortu APOSS (Abereen Prospective Osteoporosis Screening Study) <sup>180</sup>. Do sada na ljudima nisu provedena istraživanja sa nedostatkom Si u prehrani, ali takva istraživanja na laboratorijskim životinjama rezultirala su slabljenjem čvrstoće nogu i kljunova kod pilića <sup>177</sup> te defektima u razvoju lubanja štakora <sup>159</sup>. Dodatni dokaz pružaju i istraživanja na implantatima koji sadrže Si jer takvi omogućuju spontano stvaranje biološki aktivnog sloja sličnog apatitu na njihovoj površini za razliku od onih koji nemaju silicija <sup>181</sup>. Mehanizmi nisu jasni, no vjeruje se da je silicij uključen u stvaranje kosti putem sinteze odnosno stabilizacije kolagena <sup>160</sup>.

Toksičnost. Toksičnost povezana s inhalacijom čestica silicija i silikata kao što su kvarc i azbest ekstenzivno je istraživano s obzirom da dugotrajna izloženost oštećuje pluća što dovodi do smanjenja plućnog kapaciteta, karcinoma pluća i povećanog rizika od tuberkuloze i komplikacija na srcu. Te silikatne čestice fagocitirane su od strane makrofaga koji potom izlučuju citokine koji privlače i stimuliraju druge stanice uključujući fibroblaste koji su odgovorni za proizvodnju kolagena što je karakteristično za silikozu <sup>182</sup>.

Unos kristala ili amorfnog silicija/silikata hranom, također, može biti toksičan. Silikati iz tla koji se nađu u vodi za piće dovedeni su u vezu s „endemskom“ ili „balkanskom nefropatijom“ što je, zapravo, intersticijski nefritis koji se nalazi u nekim dijelovima Balkana, a prisutna je i u Hrvatskoj <sup>183</sup>. Slična oštećenja nastaju i kod pretjeranog uzimanja lijekova koji sadrže silicij, npr. analgetici i antacidi <sup>160</sup>. Nije poznato da postoje simptomi povezani sa viškom ili manjkom silicija u ljudi.

## 1.6.7 Stroncij (Sr)

### 1.6.7.1 Uvod



Stroncij je divalentni kation, molekularne težine 87,62 kDa; 15. element po zastupljenosti u Zemljinoj kori, koncentracije oko 450 p.p.m. Do atomske ere, interes za stroncij bio je ograničen. Uglavnom ga se koristilo za uklanjanje čestica plina iz vakuumskih cijevi, dodavanje crvene boje signalnim raketama i rafiniranje šećera. Radioaktivni stroncij, produkt

fisije nuklearne reakcije, kada se pojavio, počeo je predstavljati opasnost za biosferu zbog svog dugog poluživota (28,6 godina), afiniteta za odlaganjem u kosti i zube i zbog svoje sličnosti kalciju i visoke radioaktivnosti oslabljenih alfa čestica<sup>184</sup>.

U koncentracijama u kojima se nalazi u prirodi, stroncij nije toksičan i ne predstavlja opasnost za organizam. U oceanskoj vodi, najzastupljeniji je od svih elemenata u tragovima gdje mu je prosječna koncentracija  $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>185,186</sup>.

### 1.6.7.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Stroncij je član alkalnih zemljanih elemenata, atomskog broja 38 i atomske mase 87,62. Posjeduje četiri stabilna izotopa: <sup>84</sup>Sr, <sup>86</sup>Sr, <sup>87</sup>Sr i <sup>88</sup>Sr.<sup>166</sup> Burno reagira sa vodom stvarajući pritom SrOH i oslobađajući H<sub>2</sub>. Po svojim kemijskim karakteristikama sličan je i nalazi se između kalcija i barija.

Nadalje, posjeduje mnogo radioaktivnih izotopa (masenog broja 82, 85, 85m, 87m, 89, 90, 91, 92 i 93). Samo se jedan dio izotopa koristi u medicini, biologiji i biokemiji, uglavnom kao biljezi za metabolizam kalcija <sup>184</sup>.

#### 1.6.7.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Razine stroncija koje se nalaze u biljkama dosta variraju. Koncentracije u različitom bilju iz različitih okoliša iznose od 1 do 170  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sa srednjom vrijednosti od 36  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Čini se da biljke apsorbiraju kalcij i stroncij proporcionalno njihovoj relativnoj koncentraciji u tlu, te da biljke koje inače apsorbiraju više kalcija kao što su mahunarke (dvosupnice) ujedno apsorbiraju i više stroncija od jednosupnica <sup>188</sup>.

Malo se zna o distribuciji stroncija u tkivima životinja osim nekih informacija o koncentracijama radionuklida mjerenih u  $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>189</sup>. Ekstenzivnija istraživanja prehrambenih namirnica pokazala su da ih je većina siromašna stroncijem ( $<10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Najviše koncentracije ( $>100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nađene su u ribljem brašnu, brazilskim oraščićima, cimetu i kelju <sup>184</sup>.

#### 1.6.7.4 Unos, apsorpcija i metabolizam

Eksperimenti provedeni na laboratorijskim životinjama pokazali su da se (radioaktivni) stroncij brzo odlaže u kost odakle se postupno polako uklanja normalnim metaboličkim procesima pregradnje kosti. Relativno brzo odlaganje u kost odvija se u novom koštanom tkivu dok se isti proces u staroj kosti odvija sporije. Proces odlaganja u kost ovisan je o dozi i o vremenu izloženosti <sup>190</sup>.

Od ukupne količine stroncija u životinjama kralježnjacima i ljudima, više od 99% nalazi se u kostima i vezivnom tkivu, što iznosi oko 320 mg u odrasle osobe koja teži

70 kg<sup>186,191</sup>. Istraživanja na životinjama i ljudima pokazala su da je crijevne apsorpcije stroncija i kalcija usporedive, što je dovelo do razvoja hipoteze da ova dva elementa dijele zajednički prijenosni sustav u crijevima<sup>192</sup>. Stroncij i kalcij vrlo su slični po tome kako tijelo njima raspolaže; oba elementa apsorbiraju se putem probavnog sustava, koncentriraju u kosti i izlučuju primarno urinom. Apsorbiraju se u crijevima istim mehanizmom, a jedan od načina ugradnje stroncija u kost uključuje ionsku izmjenu sa koštanim kalcijem. Više stroncija apsorbira se prilikom dijete siromašne kalcijem, a manje kod dijete bogate kalcijem, dok stroncij, pak, inhibira sintezu 1,25-dihidroksikolekalciferola (vitamin D) i crijevnju apsorpciju kalcija<sup>190,193</sup>.

Stroncij koji se nađe u fecesu dvostrukog je podrijetla – jednim dijelom je neapsorbirani, *per os* unesen, dok ga drugim dijelom aktivno izlučuju crijeva što je u neposrednoj korelaciji sa koncentracijom u krvi. Zdravi bubrezi eliminiraju većinu apsorbiranog stroncija, dok se manjim dijelom izlučuje putem fecesa i znoja.

Bioraspoloživost stroncija normalnim dnevnim unosom hrane je oko 20%<sup>184</sup>. Stroncij je nađen u novorođenčadi što je bio dokaz da prolazi placentalnu barijeru. Nadalje, koncentracije su relativno konstantne tijekom života u mekim tkivima jetre, slezene i mišića, dok se povećavaju u bubrezima i plućima<sup>194</sup>.

Prema nekim autorima srednja vrijednost stroncija u serumu je  $14 \cdot 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ <sup>175</sup>, dok je u plazmi  $29 \cdot 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ <sup>195</sup> na što utječe sadržaj proteina.

#### 1.6.7.5 Utjecaj na zdravlje

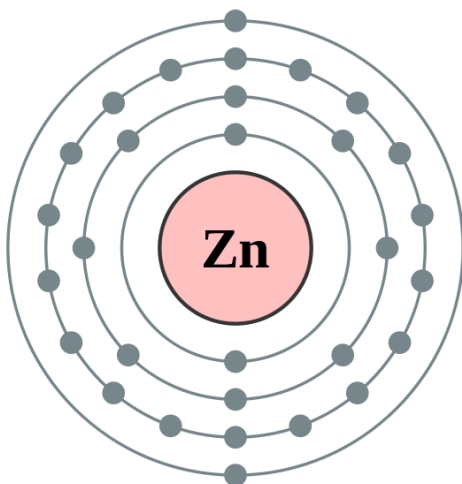
Iako su dosadašnje spoznaje o toksičnosti stroncija ograničene, čini se da pripada skupini nisko toksičnih elemenata<sup>184</sup>. Toksičnost ovisi o dozi odnosno koncentraciji i brzini kojom se ta doza unosi. Neki štetni učinci vezani su na funkciju bubrega. Naime, više elemenata u tragovima nakuplja se u kostima u bolesnika sa



bubrežnim zatajenjem; uključujući aluminij, kadmij, krom, bakar, fluor, željezo, lantan, olovo, stroncij i cink <sup>196,197</sup>. Za neke od ovih elemenata sumnja se da imaju negativne učinke na mineralizaciju. Biopsije kosti otkrile su da su koncentracije stroncija kao omjer Sr/Ca povišeni u bolesnika sa osteomalacijom <sup>198</sup>. Istraživanja na štakorima pokazala su da visoke doze stroncija, >8 mmol/kg/dan (>2·10<sup>3</sup> mg/kg/dan), izazivaju promjene u mineralizaciji što se očituje u smanjenju mineralne gustoće i smanjenju količine koštanog apatita <sup>199</sup>. Iako podaci više istraživanja govore u prilog kauzativne uloge stroncija u razvoju osteomalacije, daljnja istraživanja su potrebna da bi se nedvojbeno dokazala patološka povezanost, odnosno da se odrede pragovi razina toksičnosti <sup>191</sup>. Štoviše, male doze stroncija povećavaju stvaranje kosti što rezultira povećanom koštanom gustoćom <sup>186</sup>.

## 1.6.8 Cink (Zn)

### 1.6.8.1 Uvod



Cink je tijekom povijesti nesvjesno korišten u proizvodnji mjedi od 4. stoljeća naše ere. Kao zasebni element, prvi je puta otkriven u Indiji u 13. st., dok u Europi tek početkom 16. st. od strane Ebenera von Nürnberga. Igra važnu ulogu kao esencijalni element u svim živim bićima od bakterija do ljudi. Detekcija cinkovih metaloenzima i njihova biološka uloga

postupno postaje sve značajnija za bolje razumijevanje metabolizma cinka i njegovih interakcija sa ostalim esencijalnim i neesencijalnim elementima.

Toksičnost cinka i drugih spojeva koji ga sadrže u pravilu je mala, a svakako manje značajna u usporedbi sa njegovim manjkom u ishrani <sup>200</sup>.

#### 1.6.8.2 Fizikalna i kemijska svojstva

Čisti cink plavičasto je bijele boje, razmjerno je mekan metal koje tvori heksagonalne kristale. Atomskog broja 30 pripada grupi IIB i 4. periodi u periodnom sustavu elemenata. U prirodi, cink je mješavina 5 stabilnih izotopa: <sup>64</sup>Zn (49%), <sup>66</sup>Zn, <sup>68</sup>Zn, <sup>67</sup>Zn i <sup>70</sup>Zn <sup>201</sup>. Zbog svojih amfoternih svojstava, može stvarati veliki broj soli. Klorat, klorid, sulfati i nitrati topivi su u vodi za razliku od oksida, karbonata, fosfata, silikata, sulfida i organskih kompleksa <sup>202</sup>.

#### 1.6.8.3 Raspodjela u okolišu, hrani i živim organizmima

Cink je prosječno prisutan u Zemljinoj kori u koncentraciji od  $70 \text{ g} \cdot \text{t}^{-1}$ , rijetko se nalazi u svojem metalnom obliku, no čest je sastojak mnogih minerala. Razine koncentracija u tlu mogu varirati i do 4 reda veličine.

Raširena mu je primjena u industriji, najviše kao zaštitni sloj na drugim metalima, nadalje u proizvodnji boja, građevinskoj industriji i proizvodnji legura (mjed, bronca). Često se koristi kao katalizator, kao reducirajući i precipitirajući agens u organskoj i analitičkoj kemiji. Cinkov klorid, sulfid i sulfat zastupljeni su u dentalnoj, medicinskoj i kućnoj uporabi. Cinkov oksid koristi se za proizvodnju medicinskih masti i prašaka, a soli kao dodaci u farmaceutskim pripravcima (npr. inzulin) <sup>201</sup>. Organski cinkovi spojevi koriste se kao fungicidi, topički antibiotici i lubrikanti <sup>200</sup>.

Koncentracija cinka u biljkama je specifična za vrstu biljke, ovisna o njezinoj starosti i dostupnosti cinka u tlu. Mlade biljke načelno sadrže veće količine. Prosječna koncentracija u biljkama je između 15 i 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suhe tvari. Što se tiče životinja, vrlo je širok raspon koncentracija, ovisno o vrstama, staništu i organskim sustavima. Primjerice, koncentracije u morskim ribama kreću se od 3 do 8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , do skoro  $2\cdot 10^3$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  u kamenicama. Prosječna koncentracija u kostima sisavaca iznosi od 75 to 170  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>200</sup>.

Cink se može naći u svim tkivima i tjelesnim tekućinama u ljudi. Esencijalan je za rast, razvoj i reprodukciju. Poremećaji metabolizma cinka vezani su većinom za nedostatak nego za višak.

Ukupni sadržaj cinka u odrasle osobe (70 kg) iznosi od 1,5 do 3 g od čega se dnevno nadoknađuje oko 0,1% <sup>203</sup>. Većina se nalazi u mišićima (~60%), kostima (~30%), koži i srcu (~6%), jetri (~5%), probavnom sustavu i gušterači (~3%). U svim drugim organskim sustavima sadržaj cinka manji je od 1% <sup>204,205</sup>. Kosa najbolje odražavaju status cinka zbog toga što jedina nije uključena u mehanizam homeostaze, pa koncentracije ovise o unosu <sup>206</sup>.

Najviše koncentracije (izražene u  $\mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nalaze se u prostati i retini (~130) nakon čega slijede nokti (73-304), kosti (535-117), poprečno prugasta miškulatura (38-70), bubreg (25-85), gušterača (23-41), štitnjača (24-37), testis (12-28), jetra (8-16) i koža (6-19). Puna krv sadrži 4,8-9,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , serum ili plazma 0,7-1,8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (serum oko 16% više) <sup>200</sup>.

#### 1.6.8.4 Unos, apsorpcija i metabolizam

Cink se u organizam unosi gotovo u potpunosti putem hrane dok doprinos vode za piće i zraka može biti zanemaren. Ukupni unos dnevno varira od 5 do 16 mg.

Potrebe za Zn povećavaju se s dobi, a dodatno je potreban tijekom trudnoće i dojenja<sup>207</sup>. Dnevna potreba za cinkom u osoba od 14 do 18 godina iznosi 11 mg za muškarce, a 9 mg za žene. Dok se za starije muškarce od 18 godina preporuka ne mijenja, za žene iznosi 8 mg (11 mg za vrijeme trudnoće, 12 mg za vrijeme dojenja)<sup>208</sup>.

Studije su pokazale širok raspon gastrointestinalne apsorpcije od 20 do 80% što je ovisno o više čimbenika – nutritivnom statusu Zn u organizmu (u slučaju nedostatka više ga se apsorbira) s time da je prosječno oko 30% u ljudi adekvatnog nutritivnog statusa.<sup>206</sup> Osim nekih patoloških stanja koja snižavaju stopu apsorpcije, negativno djeluju i neki antagonisti u hrani kao što su visoki unos kalcija, željeza, nikla, magnezija, kadmija, fosfora, fitata i vlakana<sup>200,209,210</sup>.

Jednom apsorbiran, predominantno se transportira putem albumina u plazmi. Eliminacija se većinom obavlja probavnim sustavom (70-80% unesenog Zn) što čini oko 5-10 mg na dan, dok se urinom izlučuje do 0,6 mg. Zn u urinu većinom je vezan za aminokiseline i porfirine i ne korelira se varijablama koje određuju razinu Zn u serumu<sup>211</sup>. Dodatni gubici Zn mogu biti u okviru ejakulacije, menstruacije te rasta kose i noktiju. Sjemenja tekućina bogata je Zn i sadrži oko 9 µmol Zn. Za uobičajen rast kose i noktiju troši se oko 0.5 µmol Zn na dan<sup>212</sup>.

#### 1.6.8.5 Utjecaj na zdravlje

Određivanje nutritivnog statusa je teško za izmjeriti koristeći standardne laboratorijske testove zbog svoje distribucije u tijelu kao komponente brojnih proteina i nukleinskih kiselina<sup>213</sup>. Koncentracije Zn u plazmi ili serumu najčešće su korištene kao indikatori za procjenu nedostatka Zn, no te vrijednosti nužno ne odražavaju stanični status cinka zbog njegove stroge homeostatske kontrole<sup>203</sup>.

Manjak cinka. Manjak Zn karakteriziran je usporenim rastom, gubitkom apetita i poremećajem imunog odgovora. U težim slučajevima uzrokuje gubitak kose, proljev, usporeno spolno sazrijevanje, impotenciju, hipogonadizam u muškaraca, te očne i kožne promjene <sup>208</sup>.

Teški nedostatak Zn oslabljuje imunološki sustav, a već blagi do umjereni stupanj može pogoršati funkciju makrofaga i neutrofila, aktivnosti NK stanica (stanice prirodni ubojice, engl. *natural killer*) i aktivnosti komplementa, te razvoj i aktivaciju T-limfocita. Također Zn pomaže održavanju integriteta kože i sluznica <sup>214</sup>.

Višak cinka. Toksičnost cinka iznimno je rijetka, a može se manifestirati u akutnom i kroničnom obliku. Akutna neželjeni učinci uključuju mučninu, povraćanje, gubitak apetita, abdominalne kolike, proljev i glavobolju.

Gornje granice tolerancije unosa Zn za muškarce i žene od 14 do 18 godina iznose 34 mg, a iznad 18 godina do 40 mg Zn <sup>189</sup>. Smatra se da dugotrajno unošenje viših vrijednosti od navedenih može dovesti do kroničnog otrovanja <sup>215</sup>.

## 2 HIPOTEZA

Osnovna je pretpostavka ovog istraživanja da se profili bioelemenata (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn) u kosi i krvi razlikuju ovisno o spolu i dobi, odnosno, da postoje razlike u metabolizmu osteotropnih elemenata između žena i muškaraca.

Nadalje, za pretpostaviti je da postoji međusobna korelacija između bioelemenata sa sličnom metaboličkom funkcijom vidljiva unutar pojedinih tkiva, tj. u kose i krvi.

### 3 CILJEVI RADA

#### 3.1 Glavni cilj istraživanja

U ovom istraživanju glavni cilj je ispitati kako se elementi koje nalazimo u kosti (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn) odlažu u biološkim indikatorskim tkivima pune krvi i kose (bioindikatori) u ovisnosti o spolu u odraslih i zdravih ispitanika.

#### 3.2 Specifični ciljevi istraživanja

1. Usporediti koncentracije osteotropnih elemenata (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn) ovisno o spolu u kosi i punoj krvi.
2. Usporediti koncentracije pojedinih elemenata (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn) ovisno o izabranom uzorkovanom biološkom indikatorskom tkivu; o kratkoročnom (puna krv) i dugoročnom (kosa) indikatorskom tkivu.
3. Uspoređivanje sličnosti i razlika između parova različitih elemenata (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn) unutar pojedinog uzorkovanog tkiva (kose i pune krvi).

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 Uvod

Radi se o prospektivnom opservacijskom kliničkom, epidemiološkom i laboratorijskom istraživanju vođenom prema opće prihvaćenim principima kliničkog istraživanja<sup>216,217,218,219</sup>. Istraživanje je odobreno od strane Etičkih povjerenstava Instituta za istraživanje i razvoj održivih ekosustava (IRES, Velika Gorica) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prije prikupljanja uzoraka svim ispitanicima uzeta je anamneza od strane licenciranog liječnika. Uvjet je bio da je osoba punoljetna te da do tada nije bila teže bolesna tako da su u ispitivanje uključeni samo zdravi ispitanici. Istraživanje se provelo u skladu s Helsinškom deklaracijom o istraživanjima na ljudima i hrvatskim nacionalnim zakonima i pravilnicima<sup>220</sup>. Svaki ispitanik potpisao je informirani pristanak (engl. *informed consent*) i ispunio kratki upitnik o svom zdravstvenom stanju<sup>221</sup>.

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 192 ispitanika (109 žena, 83 muškarca) sa područja grada Zagreba i okolice koji su se javili zbog osobnog interesa za uvidom u status bioelemenata u uzorkovanim tkivima. Ispitanici su podijeljeni podjednako po spolu i s obzirom na dobnu pripadnost što odražava realnu situaciju unutar populacije. Ispitanu biološku matricu predstavljaju uzorci pune krvi i kose, koji su uzeti inicijalno prilikom uključivanja u istraživanje. Podaci o bojenju kose i pripremu šampona uzeti su u obzir prije svake analize i predloženi su nadležnim osobama u analitičkom laboratoriju radi eventualne korekcije.



Od svih ispitanih prikupljeni su i analizirani uzorci kose, dok je analizirano ukupno 158 uzoraka krvi (88 žena i 70 muškaraca). Uzorci koji nedostaju do ukupnog broj koliko ih ima za kosu, izgubljeni su prije učinjene analize.

Koncentracija elemenata u uzorku izražena je u mikrogramima elementa po gramu uzorkovanog tkiva ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Krv je iz periferne vene vađena od strane licencirane medicinske sestre. Uzorak kose dobiven je rezanjem kose škarama sa zatiljnog dijela glave (lat. *protuberantia occipitalis externa*). Uzorci su oprani, razloženi u kiselinu i analizirani metodom induktivno izazvane atomske emisijske spektrometrije s izvorom plazme (eng. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS), u suradnoj ustanovi Center for Biotic Medicine (CBM), Moskva, Rusija.

U radu su korištene referentne vrijednosti za elemente koje rabi CBM, a usporedive su s onima iz Toxiba, Basel, Švicarska i Great Plains Laboratories, SAD. Prvo navedeni laboratorij posjeduje certifikat ISO 9001.

Svo stakleno posuđe marke je Pyrex®, kalibrirane pipete su marke Transferipipette® (Brand, Wertheim, Njemačka), a sve kemikalije proizvedene su od strane proizvođača Suprapur (Merck, Darmstadt, Njemačka). Samo redestilirana H<sub>2</sub>O je korištena za analizu.

#### 4.2 Sakupljanje i obrada uzoraka

Kosa. Analiza kose učinjena je po smjernicama IAEA <sup>222</sup> i drugih uvriježenih analitičkih metoda i procedura <sup>223</sup>. Otprilike 0,5 do 1 gram kose odrezano je sa zatiljnog (okcipitalnog) dijela vlasišta od svih 192 ispitanika (109 žena, 83 muškarca) i spremljeno u numerirane kuverte prije no što su poslone na analizu. Pojedinačni

uzorci kose odrezani su steriliziranim škarama sa titanskom prevlakom (Suvorna Components Private Ltd., Hyderabad, Andra Pradesh, Indija) na duljinu manju od 1 cm, miješani tijekom 10 minuta u otopini etiletera i acetona (u omjeru 3:1), isprani tri puta redestiliranom H<sub>2</sub>O, sušeni na temperaturi od 85°C tijekom jedan sat, uronjeni tijekom jedan sat u otopini 5% EDTA (etilen-diamin-tetraoctena kiselina), ponovo oprani u redestiliranoj H<sub>2</sub>O, osušeni na temperaturi od 85°C tijekom 12 sati, te mokro razgrađeni u otopini HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u plastičnoj epruveti. Kosa je razložena mikrovalovima uz HNO<sub>3</sub> (Fluka #02650 Sigma-Aldrich, Co.) u Berghof SW-4 DAP-40 mikrovalnom sustavu (Berghof Products + Instruments GmbH, 72800 Eningen, Njemačka), razrijeđena 1:150 deionizirnom vodom (DIW), sonificirana i analizirana u ICP MS sustavu.

Kao referentni materijal za analizu uzoraka kose korišten je *Human Hair Reference Material* (Shangai Institute of Nuclear Research, Academia Sinica, Shanghai, Kina).

Krv. Venska krv sakupljena je u kodirane plastične bočice (BD Vacutainer®, Beckton Dickinson, Plymouth, UK) koje su randomizirane za analizu. Analiza krvi učinjena je po uvriježenim smjernicama za analitičke metode i procedure<sup>223</sup>. Krv za ICP-MS (0,5 ml) otopljena je u mikrovalnoj pećnici uz 0,1 ml HNO<sub>3</sub> (Khimmed Sinetz, Moskva, Rusija) na temperaturi od 175°C.

Kao referentni materijal za analizu uzoraka krvi, korišten je liofilizirani Seronorm TM Trace Elements Whole Blood Reference Standards Level 1 (OK0036), Level 2 (MR9067) i Level 3 (OK0337) za MP u krvi (SERO AS, Billingstadt, Norveška). Pet ml redestilirane vode dodano je svakom referentnom standardu i miješano polako na sobnoj temperaturi tijekom dva sata do ekvibracije. Jedan ml takvog ekvilibriranog standarda pipetirano je u 25 ml-sku bočicu od kvarcnog stakla,

sušeno na temperaturi od 105°C, te pretvoreno u pepeo u električnoj peći na 450°C tijekom 24 sata. Ohlađeni pepeo otopljen je u 5 ml redestilirane H<sub>2</sub>O uz dodatak 0,1 ml koncentriranog HNO<sub>3</sub>.

Sakupljeni uzorci kose i krvi kodirani su dvostruko slijepo, te poslani na analizu. Po dolasku rezultata analize, podaci su dešifrirani i rezultati pridodani pripadajućem ispitaniku. Svaki ispitanik predstavlja 0,52% ukupne istraživane populacije. Svaki nalaz sastoji se iz 8 elemenata u svakom uzorku biološke matrice iz kose i krvi: bor (B), barij (Ba), kalcij (Ca), magnezij (Mg), fosfor (P), silicij (Si), stroncij (Sr) i cink (Zn).

Sve ICP-MS analize izvedene su aparatom Elan 9000 (Perkin-Elmer, USA). Kemikalije su bile stupnja čistoće *p.a.* (Khimmed Sintez, Moskva, Rusija).

#### 4.3 Statističke metode

Rezultati su iskazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom te medijanom i obrađeni suvremenim statističkim metodama koje uključuju  $\chi^2$  test, *pair-wise* usporedbe, *post-hoc* Scheffeov test, faktorsku analizu, Mann-Whitney *U* test te Spearmanovu i Pearsonova bivarijatnu (dvosmjernu, engl. *two-tailed*) korelaciju.

##### 4.3.1 Faktorska analiza

Da je matrica pogodna za faktorsku analizu provjereno je Keiser-Meyer-Olkinovim testom (KMO) za mjeru adekvatnosti uzorkovanja pri čemu vrijednosti iznad 0,5 zadovoljavaju i Bartlett-ovim testom na razini značajnosti  $p < 0,05$ <sup>224,225</sup>. U ovome istraživanju ispitana veličina uzorka zadovoljava navedene kriterije: KMO

0,605, Bartlett 0,000. Prilikom ekstrakcije izdvojeni su faktori sa *Eigenvalue* iznad 1. Pri daljnjoj analizi regresijskom metodom (korištena je *Varimax* rotacija) dobiveni su tzv. faktorski bodovi koji predstavljaju rezultat odnosno položaj ispitanika na pojedinom faktoru <sup>225</sup>. Vrijednosti faktorskih bodova kreću se od -1 do 1. Razina značajnosti razlika postavljena je na  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2 Mjere varijabilnosti

Mjere varijabilnosti – koeficijent asimetrije (engl. *skewness*) i koeficijent spljoštenosti (engl. *kurtosis*) korištene su za procjenu distribucije uzorka. *Skewness* za provjeru pozitivnog ili negativnog (horizontalnog) odstupanja, odnosno je li empirijska razdioba pozitivno ili negativno asimetrična (grafički: skreće li razdioba u lijevu ili desnu stranu). Isto tako mjera *kurtosis* korištena je za procjenu odstupanja po visini (vertikalnog); grafički: je li razdioba izdužena (leptokurtična), srednja (mezokurtična) ili spljoštena (platikurtična). *Kurtosis* se uspoređuje sa brojem 0 (koliko iznosi za normalnu distribuciju;  $< 0$  distribucija je platikurtična,  $> 0$  distribucija je leptokurtična. Za provjeru normalnosti distribucije korišteni su Kolmogorov-Smirnov test i Shapiro-Wilkov test.

#### 4.3.3 Korelacija: Pearsonov i Spearmanov test

Za potvrdu rezultata faktorske analize te za provjeru odnosa između koncentracija elemenata u kosi i krvi korišteni su Pearsonov test korelacije i Spearmanov test korelacije ranga.

Korelacija predstavlja suodnos ili međusobnu povezanost između dvije varijable predstavljene njihovim vrijednostima. Pri tome povezanost znači da je vrijednost jedne varijable moguće s određenom vjerojatnošću predvidjeti na osnovi saznanja o vrijednosti druge varijable. Međuodnos između dvije varijable možemo prikazati pomoću dvodimenzionalnog grafa gdje su vrijednosti jedne varijable označene na apscisi, a druge na ordinati. Linija regresija je pravac oko kojega se kreću točke presjeka. Što su točke bliže pravcu, korelacija je veća i obrnuto. Ovim testom provjeravali smo linearnu korelaciju gdje su točke grupirane oko pravca (za razliku od nelinearne gdje su grupirane oko neke druge krivulje).

Koeficijenti korelacije izražavaju mjeru povezanosti između dvije varijable u jedinicama neovisnima o konkretnim jedinicama mjere u kojima su iskazane vrijednosti varijabli.

Pearsonov koeficijent korelacije koristi se u slučajevima kada između varijabli promatranog modela postoji linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija. Vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije kreće se od +1 (savršena pozitivna korelacija) do -1 (savršena negativna korelacija). Predznak koeficijenta nas upućuje na smjer korelacije – da li je pozitivna ili negativna. Pearsonov koeficijent korelacije bazira se na usporedbi stvarnog utjecaja promatranih varijabli jedne na drugu u odnosu na maksimalni mogući utjecaj dviju varijabli. Označava se malim latiničnim slovom  $r$ .

Spearmanov koeficijent korelacije (produkt korelacije ranga) koristi se za mjerenje povezanosti između varijabli u slučajevima kada nije moguće primijeniti Pearsonov koeficijent korelacije, a temelji se na tome da se izmjeri dosljednost povezanosti između poredanih varijabli, a oblik povezanosti (npr. linearni oblik koji je preduvjet za korištenje Pearsonovog koeficijenta) nije neophodan. Koristi se kada

među varijablama ne postoji linearna povezanost, a nije moguće primijeniti odgovarajuću transformaciju kojom bi se povezanost prevela u linearnu. Spearmanov koeficijent korelacije kao rezultat daje približnu vrijednost koeficijenta korelacije koji se tretira kao njegova dovoljno dobra aproksimacija, a označava se kao  $\rho$  (ro) <sup>225,226</sup>.

#### 4.3.4 Mann-Whitney *U* test

Za usporedbu dvije skupine podataka (muškarci i žene) unutar pojedine biološke matrice korišten je Mann-Whitney *U* test poznat i kao „Wilcoxon Rank sum test“ <sup>225,226</sup>. Navedeni test služi za usporedbu razlika između dvije nezavisne grupe kada je zavisna varijabla bilo ordinalna bilo kontinuirana, a ne prati normalnu distribuciju. Najčešće se smatra neparametrijskom alternativnom uobičajenom nezavisnom t-testu, no za razliku njemu, Mann-Whitney *U* test dozvoljava donošenje zaključaka ovisno o pretpostavci distribucije podataka. Ovi zaključci odnose se na postojanje eventualne razlike u distribuciji između skupina te određivanjem razlika temeljenih na medijanima skupina.

Pretpostavke za korištenje testa:

(i) zavisna varijabla (koncentracije elemenata) mjerena je na kontinuiranoj skali;

(ii) nezavisna varijabla (spol) sastoji se od dvije nezavisne skupine iste kategorije;

(iii) nezavisnost zapažanja, tj. ne postoji povezanost između vrijednosti u pojedinim skupinama ili između samih skupina;

(iv) varijable ne prate normalnu distribuciju.

Razina značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .

Rezultati  $U$ -testa potvrđeni su  $\chi^2$  testom sa zadanom razinom značajnosti  $p < 0,05$  gdje su kao varijable uzeti brojevi ispitanika (uzoraka) ispod i iznad zajedničkog medijana za pojedini element.

#### 4.3.5 Derivati medijana

Za grafički prikaz odnosno usporedbu distribucije frekvencija korištena je metoda derivata medijana <sup>227</sup>.

Metoda se sastoji od određivanja ukupnog medijana populacije ili medijana unutar skupine žena odnosno muškaraca, ovisno o tome postoji li razlika između skupina. Po definiciji, polovica populacije nalazi se iznad medijana (uzlazna grana medijana  $U$ ), a druga polovica ispod medijana (silazna grana medijana  $D$ ). Dakle, veličina populacije za središnji medijan  $M_0$  je zbroj populacije na uzlaznoj i silaznoj grani koje se nalaze oko središnje točke. Obje grane mogu se dalje dijeliti po istom principu – medijan na uzlaznoj grani  $U_0$  i medijan na silaznoj grani  $D_0$  („medijan medijana“) u sekvencu derivata medijana ( $U_{0,1,2,3,\dots,n-1,n}$  i  $D_{0,1,2,3,\dots,n-1,n}$ ). Za svaki derivat medijana u populaciji može se odrediti točna koncentracija elementa.

#### 4.3.6 Software

Statističke i grafičke analize provedene su na programima SPSS 20 (IBM Corp., 2011, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0., Armonk, NY) i OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., OriginPro Version 8.0., Northhampton, MA).

## 5 REZULTATI

### 5.1 Deskriptivna statistika

#### 5.1.1 Kosa

Učinjena je deskriptivna (opisna) statistika multielementnog profila cjelovitog uzorka kose kojom su prikazane osnovne značajke uzorka: medijan, standardna devijacija, aritmetička sredina, standardna pogreška, *skeweness* i *kurtosis*. Svih osam elemenata (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn) određeno je u sva 192 uzorka kose (83 muškarca, 109 žena). Apendiks 1.

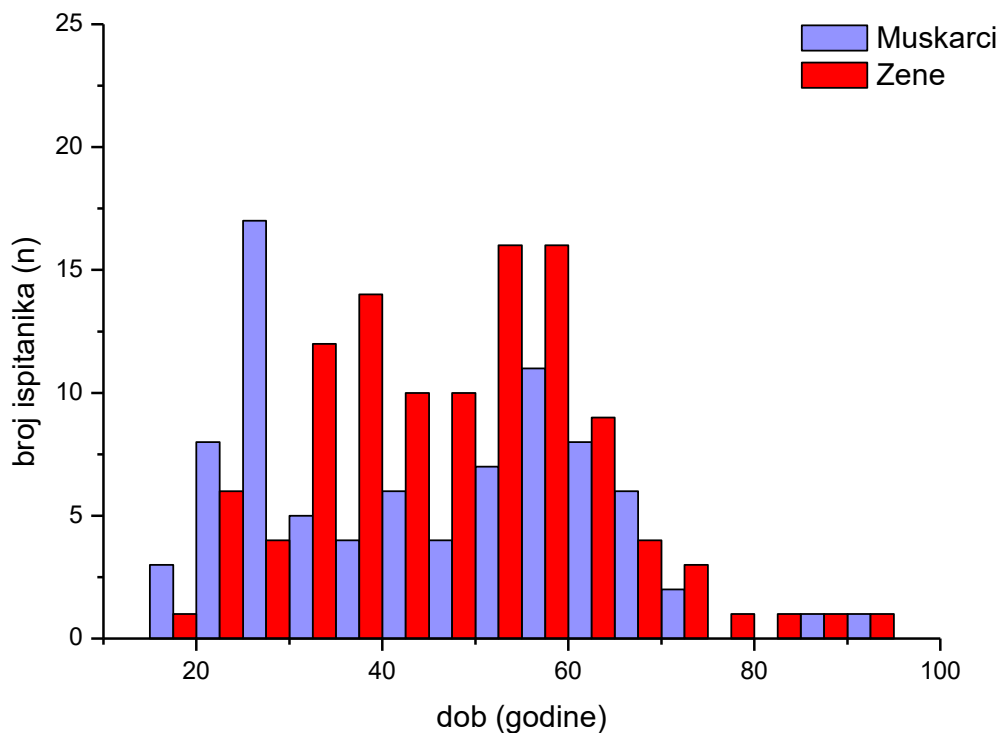
#### 5.1.2 Krv

Od svih ispitanika kojima je uzet uzorak kose analizirano je ukupno 158 uzoraka krvi (88 žene i 70 muškaraca). Uzorci koji nedostaju do ukupnog broj koliko ih ima za kosu, izgubljeni su prije učinjene analize. U 2 muškarca i 2 žene našli smo ispod granice detekcije (DL) za kalcij i fosfor ( $0,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za Ca te  $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za P). Također, 20 ispitanika (14 žena i 6 muškaraca) imalo je vrijednosti Si ispod granice detekcije u krvi ( $0,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apendiks 2.



### 5.1.3 Dob

Dobna raspodjela ispitanika prikazana je na grafu (Slika 1). Koristeći hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test dokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine ovisno o dobi ( $M_{\text{♂+♀}} = 46$  g.,  $M_{\text{♂}} = 44$  g.,  $M_{\text{♀}} = 48$  g.,  $\bar{x} = 44,68$  g.,  $\chi^2 = 0,883$ ,  $p = 0,347$ ).



Slika 1. Histogram raspodjele ispitanika po dobnim skupinama (5-godišnji intervali). Plavi stupci – muškarci; crveni stupci – žene.

## 5.2 Usporedba između skupina po spolu: Mann-Whitney $U$ test

Za provjeru normalnosti distribucije korišteni su Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilkov test za svaki set podataka. Budući da je za svaki razina značajnosti manja od 0,01, a hipoteza je bila da naša distribucija ne odstupa značajno od normalne, odbacujemo postavljenu hipotezu i zaključujemo da naša distribucija statistički značajno (na razini značajnosti od 0,01) odstupa od normalne.

Sukladno navedenom, za usporedbu dvije skupine koncentracije elemenata po spolu (muškaraca i žena) unutar kose korišten je Mann-Whitney  $U$  test kao neparametrijska alternativa t-testu.

### 5.2.1 Kosa

Nakon provedenog testa (Tablica 1a) dokazano je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija koncentracija elemenata ovisno o spolu za B, Ba, Ca, Mg, Si i Sr na razini značajnosti  $p < 0,001$ , te za p na razini značajnosti  $p < 0,05$  za apsolutnu vrijednost  $Z$  ( $|Z| > 1,96$ ). Značajnost  $p$  izračunata je u SPSS-u koristeći asimptotsku metodu (engl. *Asymptotic Method*). Sukladno rezultatima ovog testa među testiranim elementima jedino za Zn ne postoji statistički značajna razlika ovisno o spolu ( $p = 0,729$ ). Tablica 1b. Svi rezultati  $U$  testa potvrđeni su  $\chi^2$  testom sa zadanom razinom značajnosti  $p < 0,05$ , a kao varijable uzet je broj muškaraca i broj žena ( $n_{\text{♂}}$ ,  $n_{\text{♀}}$ ) koji imaju koncentracije ispod, odnosno iznad zajedničkom medijana ( $M$ ).

Distribucije su grafički prikazane na slici (Slika 2). Podaci za histogram logaritamski su transformirani da bi se vizualno normalizirala distribucija.

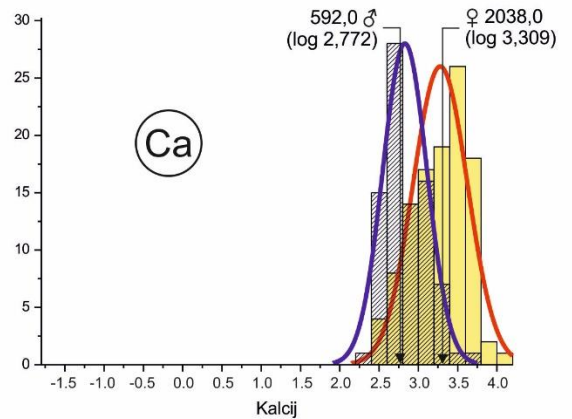
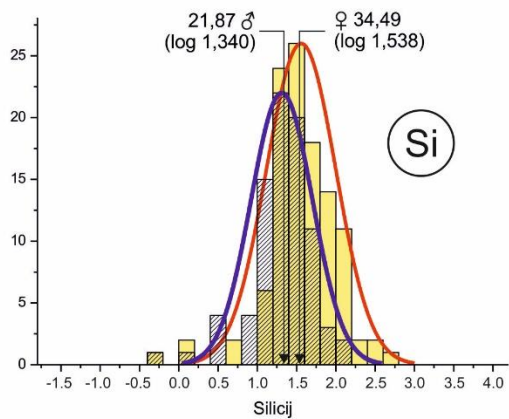
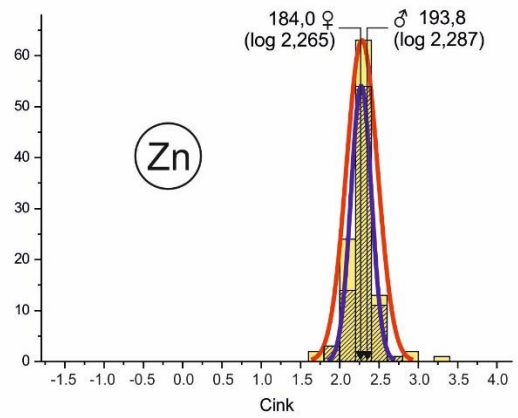
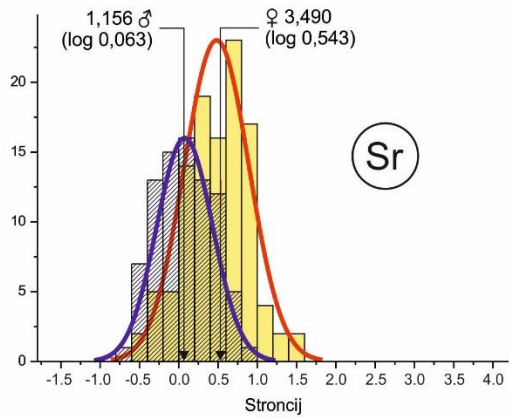
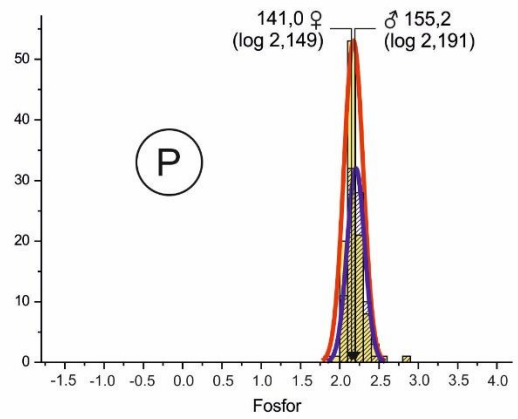
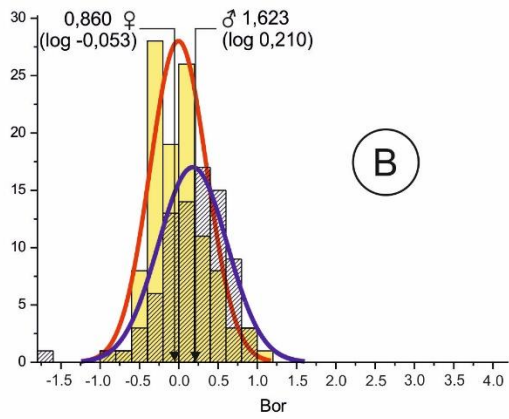
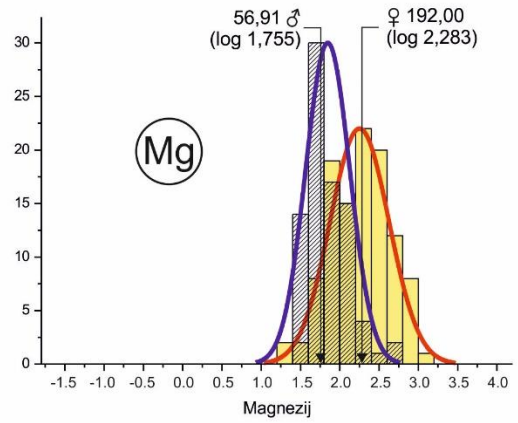
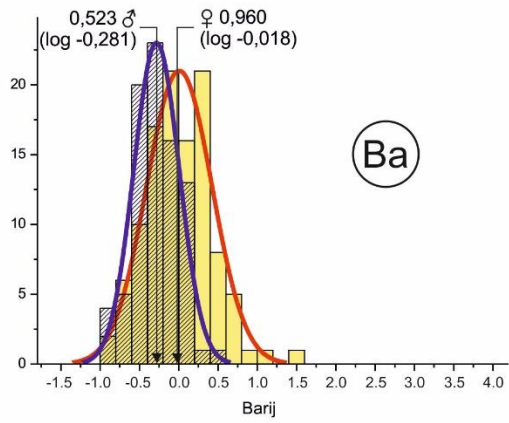
- a) Bor: muškarci imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od žena koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,006$ .
- b) Barij: žene imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od muškaraca koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .
- c) Kalcij: žene imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od muškaraca koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .
- d) Magnezij: žene imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od muškaraca koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .
- e) Fosfor: muškarci imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od žena koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p = 0,012$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,006$ .
- f) Silicij: žene imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od muškaraca koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .
- g) Stroncij: žene imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u kosi od muškaraca koristeći obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .
- h) Cink: nema statistički značajne razlike u koncentracijama između muškaraca i žena niti po jednoj od dvije korištene statističke metode;  $U$ -test:  $p = 0,729$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,662$ .

Tablica 1a. Mann-Whitney  $U$  test razlike koncentracija elemenata ovisno o spolu u kosi; za  $|Z| > 1,96$  razina značajnosti je  $p < 0,05$ . Vrijednost  $U$  je međustupanj temeljem kojega se računa vrijednost  $p$  za ovu konkretnu populaciju uz ove dobivene koncentracije istraživanih elemenata. NS = razlika nije statistički značajna.

Element	Mann-Whitney $U$	Z	p
<u>B</u>	3061,5	-3,833	,000
<u>Ba</u>	2598,5	-5,047	,000
<u>Ca</u>	1473,5	-7,996	,000
<u>Mg</u>	1751,5	-7,267	,000
<u>P</u>	3564,0	-2,515	,012
<u>Si</u>	2790,5	-4,543	,000
<u>Sr</u>	2054,0	-6,474	,000
Zn	4391,5	-,3460	NS

Tablica 1b. Sažetak rezultata Mann-Whitney *U* testa razlike koncentracija elemenata ovisno o spolu u kosi.

$\text{♂} > \text{♀}$	$\text{♂} = \text{♀}$	$\text{♀} > \text{♂}$
B	Zn	Ba
P		Ca
		Mg
		Si
		Sr



Slika 2. Normalna raspodjela elemenata u kosi. Elementi su poredani po koncentracijama u kosi u uzlaznom tijeku. ■ žene; □ muškarci. Označene su vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Apscisa: logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika (n).

### 5.2.2 Krv

*U* test ponovljen je i za sve elemente iz krvi (Tablica 2a). Statistički značajna razlika između spolova nađena je za Zn na razini značajnosti od  $<0,001$ , za Si  $<0,01$  te za B i Ba  $<0,05$  (razini značajnosti  $p < 0,05$  za apsolutnu vrijednost  $Z$  ( $|Z| > 1,96$ ). Za ostale elemente (Ca, Mg, P i Sr) nema razlike u koncentracijama elemenata u punoj krvi ovisno o spolu. Tablica 2b. Kao i u slučaju kose,  $\chi^2$  test proveden je za sve elemente sa zadanom razinom značajnosti  $p < 0,05$ , a distribucije frekvencija grafički su prikazane na kao histogram (Slika 3).  $\chi^2$  test nije potvrdio statistički značajnu razliku za B i Si.

- a) Bor: muškarci imaju statistički značajno više koncentracije od žena temeljem metode *U* testa, no ne i  $\chi^2$  testa; *U* test:  $p = 0,020$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,372$ .
- b) Barij: muškarci imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u krvi od žena koristeći obje statističke metode; *U* test:  $p = 0,025$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,002$ .
- c) Kalcij: žene imaju statistički više vrijednosti od muškaraca temeljem  $\chi^2$  testa, no ne i *U* testa; *U* test:  $p = 0,405$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .
- d) Magnezij: nema statistički značajne razlike u koncentracijama između muškaraca i žena temeljem rezultata obje statističke metode; *U* test:  $p = 0,493$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,627$ .
- e) Fosfor: nema statistički značajne razlike u koncentracijama između muškaraca i žena temeljem rezultata obje statističke metode; *U* test:  $p = 0,396$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,050$ .
- f) Silicij: muškarci imaju statistički značajno više koncentracije od žena temeljem metode *U* testa, no ne i  $\chi^2$  t; *U* test:  $p = 0,006$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,211$ .



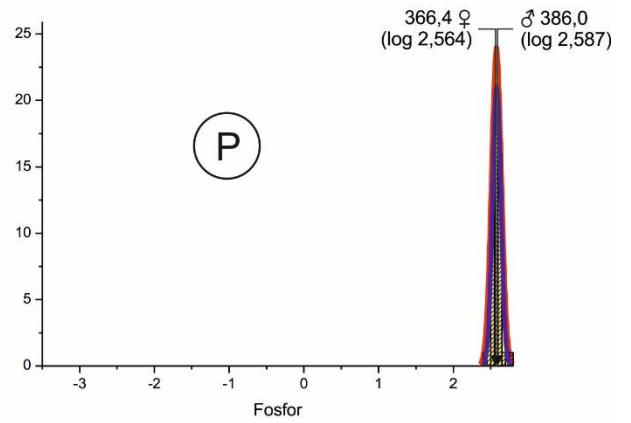
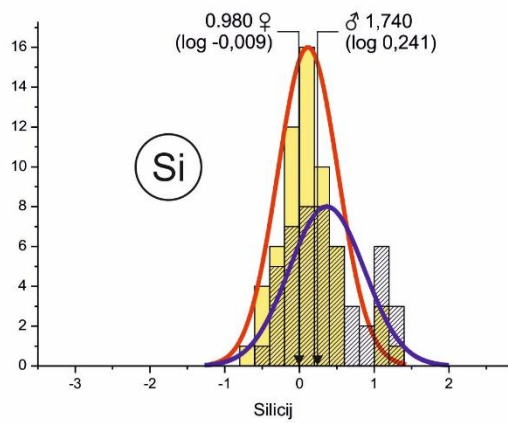
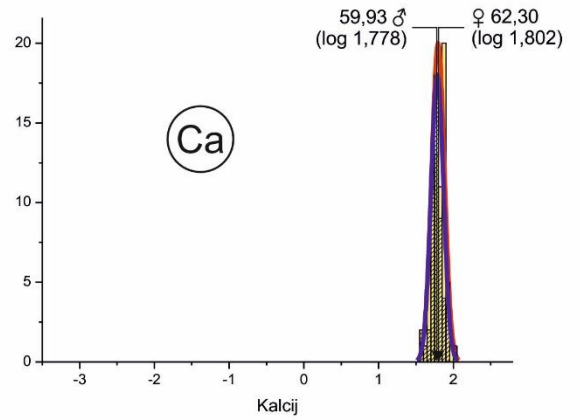
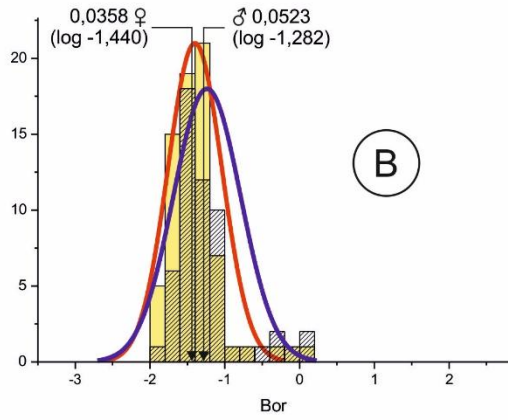
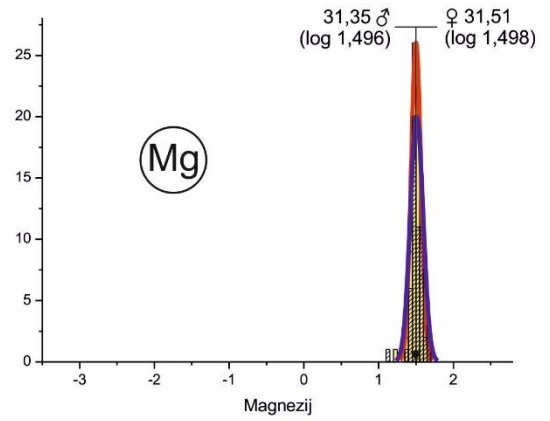
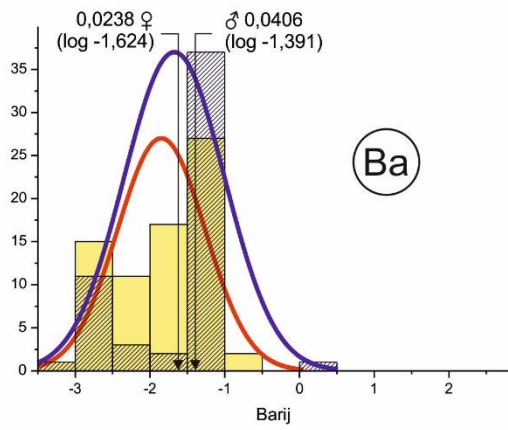
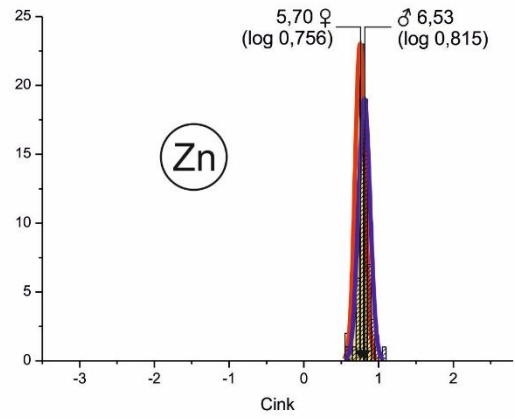
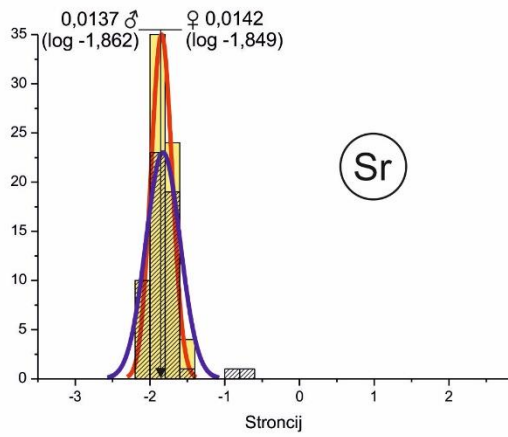
- g) Stroncij: nema statistički značajne razlike u koncentracijama između muškaraca i žena temeljem rezultata obje statističke metode;  $U$  test:  $p = 0,754$ ;  $\chi^2$ :  $p = 0,858$ .
- h) Cink: muškarci imaju statistički značajno više vrijednosti koncentracija u krvi od žena temeljem rezultata obje statističke metode;  $U$ -test:  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ .

Tablica 2a. Mann-Whitney  $U$  test razlike koncentracija elemenata ovisno o spolu u kosi; za  $|Z| > 1,96$  razina značajnosti je  $p < 0,05$ . Vrijednost  $U$  je međustupanj temeljem kojega se računa vrijednost  $p$  za ovu konkretnu populaciju uz ove dobivene koncentracije istraživanih elemenata. NS = razlika nije statistički značajna.

Element	Mann-Whitney $U$	Z	p
<u>B</u>	1523,0	-2,332	,020
<u>Ba</u>	1542,0	-2,241	,025
Ca	1834,5	-,833	NS
Mg	1865,0	-,686	NS
P	1831,0	-,850	NS
<u>Si</u>	1437,5	-2,749	,006
Sr	1942,5	-,313	NS
<u>Zn</u>	1067,0	-4,527	,000

Tablica 2b. Sažetak rezultata Mann-Whitney *U* testa razlike koncentracija elemenata ovisno o spolu u kosi.

$\text{♂} > \text{♀}$	$\text{♂} = \text{♀}$	$\text{♀} > \text{♂}$
B	Mg	Ca
Ba	P	
Si	Sr	
Zn		



Slika 3. Normalna raspodjela elemenata u krvi. Elementi su poredani po koncentracijama u kosi u uzlaznom tijeku. ■ žene; □ muškarci. Označene su vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Apscisa: logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika (n).

## 5.3 Grupiranje po spolu, dobi i koncentraciji elemenata

### 5.3.1 Faktorska analiza

Faktorska analiza korištena je za opisivanje grupiranja (engl. *clustering*) koncentracija gore navedenih elemenata, dobi i spolu ispitanika. Ukupno je korišteno 10 kvantitativnih varijabli. Varijable se u ovom slučaju odnose na spol, dob i osam elemenata (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn). Faktorski uzorci ekstrahirani su iz korelacijske matrice nakon analize glavnih komponenti (engl. *principal component*) i „Varimax“ rotacije s Kaiserovom normalizacijom. Kao snažna korelacija uzeta je ona  $>0,5$ , a značajna  $>0,3$ . Broj ekstrahiranih faktora definiran je sa *Eigenvalue* (svojstvena vrijednost) iznad 1 kao granica značajnosti, za razliku od unaprijed definiranja broja faktora.

#### 5.3.1.1 Kosa

U analiziranim uzorcima kose ( $n_{\text{♂}+\text{♀}}=192$ ), svaka od varijabli značajno je korelirana s između jedne do četiri ostale, pokazavši da su sve međuovisne. Temeljem vrijednosti *Eigenvalue* iznad 1 izolirane su 4 korelirane komponente (faktora) koji čine 67% ukupne varijance u setu podataka kao i 6 nekoreliranih komponenti (faktora) koji čine preostalih 33% od ukupne varijance (Tablica 3). Vrijednosti faktorskih opterećenja (engl. *factor loadings*) prikazana su u zagradama. Komponenta I ima snažnu korelaciju sa barijem (0,767), kalcijem (0,711), magnezijem (0,803) i stroncijem (0,949) uz dodatnu značajnu korelaciju sa ženskim spolom (0,386). Ova komponenta objašnjava 28% ukupne varijacije. Komponenta II

snažno korelira sa dobi (0,645), borom (0,773) i negativno sa cinkom (-0,536) uz dodatnu značajnu negativnu korelaciju sa kalcijem (-0,338). Ova komponenta objašnjava 14,7% ukupne varijacije. Komponenta III snažno korelira sa ženskim spolom (0,698) i silicijem (0,750) uz značajnu korelaciju sa kalcijem (0,339) i magnezijem (0,308). Ova komponenta čini 13,7% ukupne varijacije. Komponenta IV snažno korelira sa fosforom (0,921) i značajnom negativnom korelacijom sa cinkom (-0,308). Ova komponenta čini 10,7% ukupne varijacije.

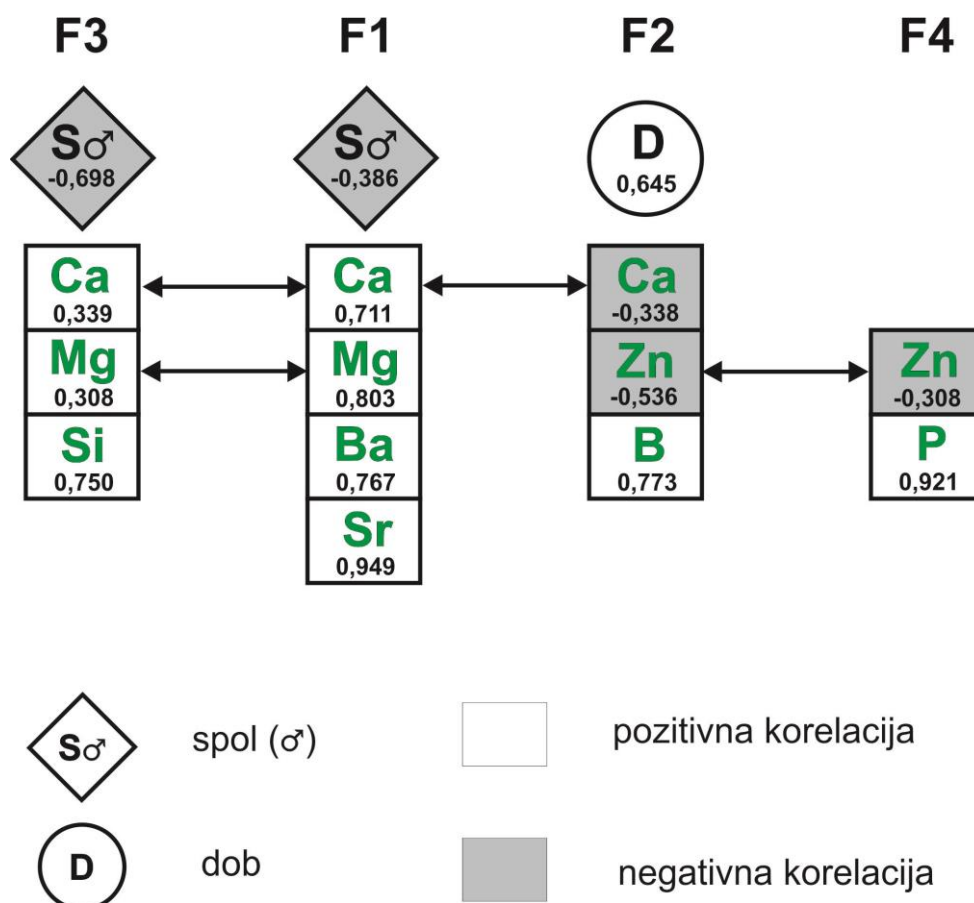
Faktorska analiza također je učinjena za muškarce i žene odvojeno što je rezultiralo dodatnim doprinosom od varijabli.

Muškarci. Analiza muške populacije ( $n_{\text{♂}}=83$ ) pronašla je 3 faktora koja zajedno čine 68% ukupne varijance. Komponenta I pokazuje snažnu korelaciju sa barijem (faktorsko opterećenje 0,805), kalcijem (0,928), magnezijem (0,889), stroncijem (0,921) i, kako je već primijećeno na zajedničkom uzorku, sa cinkom (0,578). Ova komponenta čini 39% ukupne varijacije. Komponenta II pokazuje snažnu korelaciju sa dobi (0,694) i borom (0,815) bez dodatne korelacije sa kalcijem ili cinkom što ukupno čini 14,8% ukupne varijacije. Komponenta III snažno korelira sa fosforom (0,826) i silicijem (0,718) čineći 14,2% ukupne varijacije.

Žene. Faktorska analiza ženske populacije ( $n_{\text{♀}}=109$ ) rezultirala je sa 4 komponente (faktora) koji zajedno čine 70% ukupne varijacije. Komponenta I snažno korelira sa barijem (0,732), kalcijem (0,645), magnezijem (0,796) i stroncijem (0,954) čineći 28% ukupne varijacije. Komponenta II snažno korelira sa dobi (0,786), borom (0,658) i negativno sa cinkom (-0,588) sa dodatnom snažnom negativnom korelacijom sa kalcijem (-0,339). Ova komponenta čini 17% ukupne varijacije. Komponenta III snažno korelira sa borom (0,447) i silicijem (0,908) i ukupno čini 12,7% ukupne varijacije. Naposljetku, komponenta IV objašnjava 12,3% ukupne

varijacije, a najsnažnije korelira sa fosforom (0,863), a značajno sa magnezijem (0,360) i kalcijem (0,306).





Slika 4. Shematski prikaz rezultata faktorske analize za kosu. Izdvojene su značajne korelacije. Horizontalnim linijama povezane su istovjetne varijable. F faktor, S♂ korelacija s muškim spolom, D korelacija s dobi. Horizontalnim linijama povezane su istovjetne varijable. Numerička vrijednost ispod oznake varijable (element, dob, spol) označava koeficijent korelacije.

Tablica 3. Distribucija multielementnog profila po spolu, dobi i koncentraciji elemenata u kosi: faktorska analiza ( $n_{\text{♂}+\text{♀}}=192$ ). Izdvojena su faktorska opterećenja (*factor loadings*) unutar pojedine komponente za elemente koji pokazuju snažnu korelaciju > **0,500**; značajnu korelaciju > 0,300; nema korelacije < 0,300.

Komponenta (faktor)		I	II	III	IV
<i>Eigenvalue</i>		2,803	1,466	1,370	1,066
% ukupne varijacije		28,0%	14,7%	13,7%	10,7%
Varijable	Spol (♂)	-,386	,155	<b><u>-,698</u></b>	,204
	Dob	-,001	<b><u>,645</u></b>	,216	-,204
	B	-,002	<b><u>,773</u></b>	-,130	-,013
	Ba	<b><u>,767</u></b>	,038	-,211	-,077
	Ca	<b><u>,711</u></b>	-,338	,339	,021
	Mg	<b><u>,803</u></b>	,001	,308	,145
	P	,054	-,027	,002	<b><u>,921</u></b>
	Si	-,054	,157	<b><u>,750</u></b>	,110
	Sr	<b><u>,949</u></b>	,003	,047	-,012
	Zn	,095	<b><u>-,536</u></b>	-,026	-,308

### 5.3.1.2 Krv

U uzorcima pune krvi ( $n_{\delta+\text{♀}}=158$ ), svaka od varijabli, također kao i u slučaju kose, značajno je korelirana s između jedne do tri ostale, pokazavši da su sve međuovisne. Izolirana su 4 faktora koji čine 70% ukupne varijance u setu podataka kao i 6 nekoreliranih faktora koji čine preostalih 30% od ukupne varijance (Tablica 4). Vrijednosti faktorskih opterećenja prikazana su u zagradama. Komponenta I ima snažnu korelaciju sa kalcijem (0,934) i fosforom (0,933) i objašnjava 18,5% ukupne varijance. Komponenta II snažno korelira sa stroncijem (0,938) i barijem (0,932). Ova komponenta objašnjava isto 18,5% ukupne varijance. Komponenta III snažno korelira sa magnezijem (0,666), silicijem (0,660), borom (0,632) i dobi (0,611). Ova komponenta čini 17,6% ukupne varijance. Komponenta IV snažno korelira sa cinkom (0,803), muškim spolom (0,778) uz značajnu pozitivnu korelaciju sa silicijem (0,325) i negativnu sa godinama starosti (-0,349). Ova komponenta čini 15% ukupne varijance.

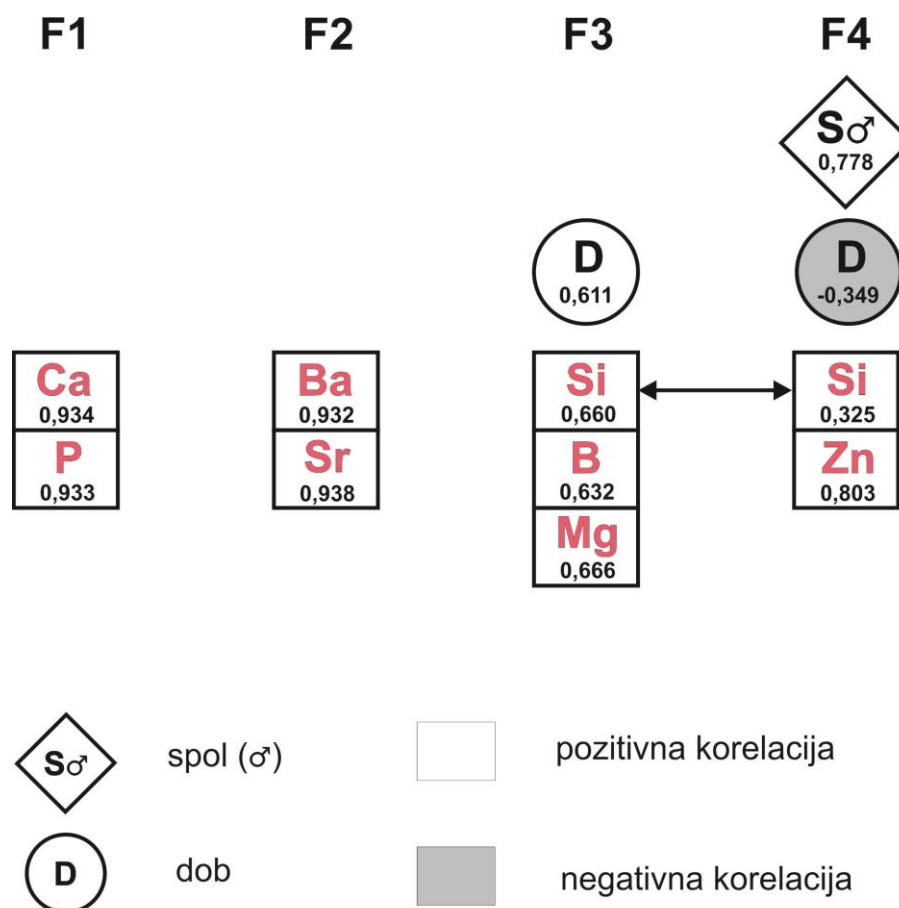
U nastavku, faktorska analiza je kao i prethodno učinjena odvojeno za muškarce i žene.

Muškarci ( $n_{\delta}=70$ ). Izdvojena su 4 faktora koji kumulativno objašnjavaju 75,8% ukupne varijance. U komponenti I snažna je pozitivna korelacija barija (0,946) i stroncija (0,961); 20,6% varijance. Komponenta II objašnjava 20,4% ukupne varijance i pokazuje snažnu korelaciju sa fosforom (0,931) i kalcijem (0,908). Komponenta III pokazuje snažnu korelaciju sa magnezijem (0,804) i silicijem (0,732) i značajnu sa godinama starosti (0,481) i objašnjava 18,4% ukupne varijance, dok komponenta IV pokazuje snažnu pozitivnu korelaciju sa borom (0,618) i godinama starosti (0,524) i negativnu sa cinkom (-0,880); 16,4% ukupne varijance.

Žene. U ženskoj populaciji ( $n_{\text{♀}}=88$ ) također se izdvajaju 4 faktora koji kumulativno čine 74,2% ukupne varijance. U komponenti I koja čini 21,7% varijance, najsnažnija je korelacija sa kalcijem (0,943) i magnezijem (0,921). U komponenti II (21,5% ukupne varijance) snažna je korelacija sa borom (0,813), silicijem (0,799) i barijem (0,726). Komponenta III (16,3% ukupne varijance) snažna je korelacija sa cinom (0,858) i magnezijem (0,676) uz značajan doprinos od godina starosti (0,416). Kao posljednja, komponenta IV objašnjava 14,6% ukupne varijance a snažnu korelaciju ima sa stroncijem (0,824) i negativnu sa godinama starosti (-0,669) uz značajan negativan doprinos od magnezija (-0,330).

Tablica 4. Distribucija multielementnog profila po spolu, dobi i koncentraciji elemenata u krvi: faktorska analiza (n+♀=158). Izdvojena su faktorska opterećenja (engl. *factor loadings*) unutar pojedine komponente za elemente koji pokazuju snažnu > **0,500**; značajnu korelaciju > 0,300; nema korelacije < 0,300.

Komponenta (faktor)	I	II	III	IV
Eigenvalue	1,852	1,850	1,755	1,499
% ukupne varijacije	18,5%	18,5%	17,6%	15,0%
Spol (♂)	-,075	,142	,180	<b><u>,778</u></b>
Dob	-,175	-,027	<b><u>,611</u></b>	-,349
B	,108	,214	<b><u>,632</u></b>	,003
Ba	-,061	<b><u>,932</u></b>	,109	-,003
Ca	<b><u>,934</u></b>	,049	,235	-,078
Mg	,123	-,130	<b><u>,666</u></b>	,106
P	<b><u>,933</u></b>	-,081	,020	,009
Si	,206	,050	<b><u>,660</u></b>	,325
Sr	,020	<b><u>,938</u></b>	-,047	,054
Zn	-,011	-,084	-,052	<b><u>,803</u></b>



Slika 5. Shematski prikaz rezultata faktorske analize za krv. Izdvojene su značajne korelacije. Horizontalnim linijama povezane su istovjetne varijable. F faktor, S♂ korelacija s muškim spolom, D korelacija s dobi. Numerička vrijednost ispod oznake varijable (element, dob, spol) označava koeficijent korelacije.

### 5.3.2 Korelacija ranga: Spearmanov test

S obzirom na oblik distribucije frekvencija, u nastavku je za mjeru snage odnosa između varijabli korišten Spearmanov test korelacije ranga (engl. *Spearman rank correlation method*) kao potvrda faktorske analize.

Rezultati su izraženi u smislu koeficijenta korelacije prema kojemu  $>0,2$  statistički značajni sa vrijednostima  $p < 0,05$ ,  $< 0,01$  i  $< 0,001$ . Korelacije su navedene redom po razini značajnosti prema vrijednosti  $p$ . Koeficijent korelacije ( $\rho$ ) rangiran je kao: 0,00-0,19 vrlo slabi, 0,20-0,39 slabi, 0,40-0,59 umjereni, 0,60-0,79 jaki i 0,80-1,00 vrlo jaki <sup>228</sup>.

#### 5.3.2.1 Kosa

Muškarci. U muškoj populaciji ( $n_{\text{♂}}=83$ ) najznačajnije korelacije vidljive su između: (1a) Ca, Ba, Mg i Sr, (1b) dobi, Ba i Sr; (2a) dobi, B, Ca i Mg, (2b) B i Zn (2c) Mg, dobi i Zn. Tablica 5.

Žene. U ženskoj populaciji ( $n_{\text{♀}}=109$ ) najznačajnija korelacija vidljiva je između: (1a) Ba, Ca, Mg i Sr, (1b) Ca i Zn; (2) bora i kalcija te bora i dobi; (3a) B, Mg i Zn, (3b) Mg, B, P i Zn, (3c) Sr i Zn. Tablica 6.

Tablica 5. Spearmanova korelacija ranga za muškarce u uzorcima kose.  $n_{\text{♂}} = 83$ .

$\rho$  (ro) = koeficijent korelacije; p = razina značajnosti;  $p < 0,05$ ;  $p < \mathbf{0,01}$ ;  $p < \mathbf{0,001}$ .

		Dob	B	Ba	Ca	Mg	P	Si	Sr
B	$\rho$ (ro)	,265							
	p	,016							
Ba	$\rho$ (ro)	<b>-,284</b>	-,192						
	p	<b>,009</b>	,083						
Ca	$\rho$ (ro)	-,251	-,200	<b>,544</b>					
	p	,022	,069	<b>,000</b>					
Mg	$\rho$ (ro)	-,241	-,100	<b>,462</b>	<b>,854</b>				
	p	,028	,367	<b>,000</b>	<b>,000</b>				
P	$\rho$ (ro)	,022	-,036	-,054	,037	,002			
	p	,847	,748	,628	,738	,986			
Si	$\rho$ (ro)	,179	,099	,041	,194	,174	,110		
	p	,106	,374	,711	,079	,115	,321		
Sr	$\rho$ (ro)	<b>-,336</b>	-,153	<b>,671</b>	<b>,798</b>	<b>,827</b>	-,087	,088	
	p	<b>,002</b>	,167	<b>,000</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,436	,431	
Zn	$\rho$ (ro)	-,085	-,235	,050	<b>,396</b>	,264	,189	,072	,144
	p	,444	,032	,655	<b>,000</b>	,016	,087	,516	,193



Tablica 6. Spearmanova korelacija ranga za žene u uzorcima kose,  $n_{\text{f}} = 109$ .

$\rho$  (ro) = koeficijent korelacije; p = razina značajnosti;  $p < 0,05$ ;  $p < \mathbf{0,01}$ ;  $p < \mathbf{0,001}$ .

		Dob	B	Ba	Ca	Mg	P	Si	Sr
B	$\rho$ (ro)	<b><u>,379</u></b>							
	p	<b><u>,000</u></b>							
Ba	$\rho$ (ro)	-,097	-,173						
	p	,315	,072						
Ca	$\rho$ (ro)	-,146	<b><u>-,354</u></b>	<b><u>,775</u></b>					
	p	,129	<b><u>,000</u></b>	<b><u>,000</u></b>					
Mg	$\rho$ (ro)	-,170	-,191	<b><u>,672</u></b>	<b><u>,829</u></b>				
	p	,078	,046	<b><u>,000</u></b>	<b><u>,000</u></b>				
P	$\rho$ (ro)	,092	,151	,122	,138	<b><u>,209</u></b>			
	p	,342	,116	,207	,153	<b><u>,030</u></b>			
Si	$\rho$ (ro)	-,094	,020	,055	,016	,070	,109		
	p	,333	,837	,570	,867	,467	,258		
Sr	$\rho$ (ro)	-,204	-,178	<b><u>,727</u></b>	<b><u>,869</u></b>	<b><u>,885</u></b>	,121	,026	
	p	,034	,064	<b><u>,000</u></b>	<b><u>,000</u></b>	<b><u>,000</u></b>	,209	,791	
Zn	$\rho$ (ro)	-,188	-,235	,104	<b><u>,266</u></b>	<b><u>,198</u></b>	,175	-,067	<b><u>,220</u></b>
	p	,051	,014	,280	<b><u>,005</u></b>	<b><u>,039</u></b>	,068	,491	<b><u>,021</u></b>

### 5.3.2.2 Krv

Muškarci. Ovom metodom među muškarcima ( $n_{\text{♂}}=70$ ) najsnažnije su korelacije: (1a) B i dobi, (1b) Ba i Si, (1c) Ca i P; (2a) Mg i dobi, (2b) Mg i B, (2c) Ba i Sr, (2d) Ca, Mg, Si i B. Tablica 7.

Žene. Kod žena ( $n_{\text{♀}}=88$ ) korelacije su redom značajnosti između: (1a) Mg, B i dobi, (1b) B i Ba, (1c) Ca, P i Si; (2) Mg i Zn; (3a) dobi, Ba, Ca i Mg, (3b) Mg, P i Sr. Tablica 8.

Tablica 7. Spearmanova korelacija ranga za muškarce u uzorcima krvi,  $n_{\text{♂}} = 70$ .

$\rho$  (ro) = koeficijent korelacije; p = razina značajnosti;  $p < 0,05$ ;  $p < \mathbf{0,01}$ ;  $p < \mathbf{0,001}$ .

		Dob	B	Ba	Ca	Mg	P	Si	Sr
B	$\rho$ (ro)	<b><u>,552</u></b>							
	p	<b><u>,000</u></b>							
Ba	$\rho$ (ro)	-,235	,168						
	p	,084	,220						
Ca	$\rho$ (ro)	,221	,294	,146					
	p	,105	,030	,287					
Mg	$\rho$ (ro)	<b>,422</b>	<b>,365</b>	,012	<b>,403</b>				
	p	<b>,001</b>	<b>,006</b>	,932	<b>,002</b>				
P	$\rho$ (ro)	-,042	-,147	-,147	<b><u>,579</u></b>	,243			
	p	,761	,286	,285	<b><u>,000</u></b>	,074			
Si	$\rho$ (ro)	-,094	,076	<b><u>,540</u></b>	<b>,351</b>	,090	,146		
	p	,496	,581	<b><u>,000</u></b>	<b>,009</b>	,515	,288		
Sr	$\rho$ (ro)	-,050	,160	<b>,352</b>	,185	-,129	-,157	,026	
	p	,718	,243	<b>,008</b>	,177	,346	,253	,849	
Zn	$\rho$ (ro)	-,237	-,122	,231	-,091	,049	,065	-,075	,096
	p	,082	,375	,090	,508	,723	,636	,588	,488

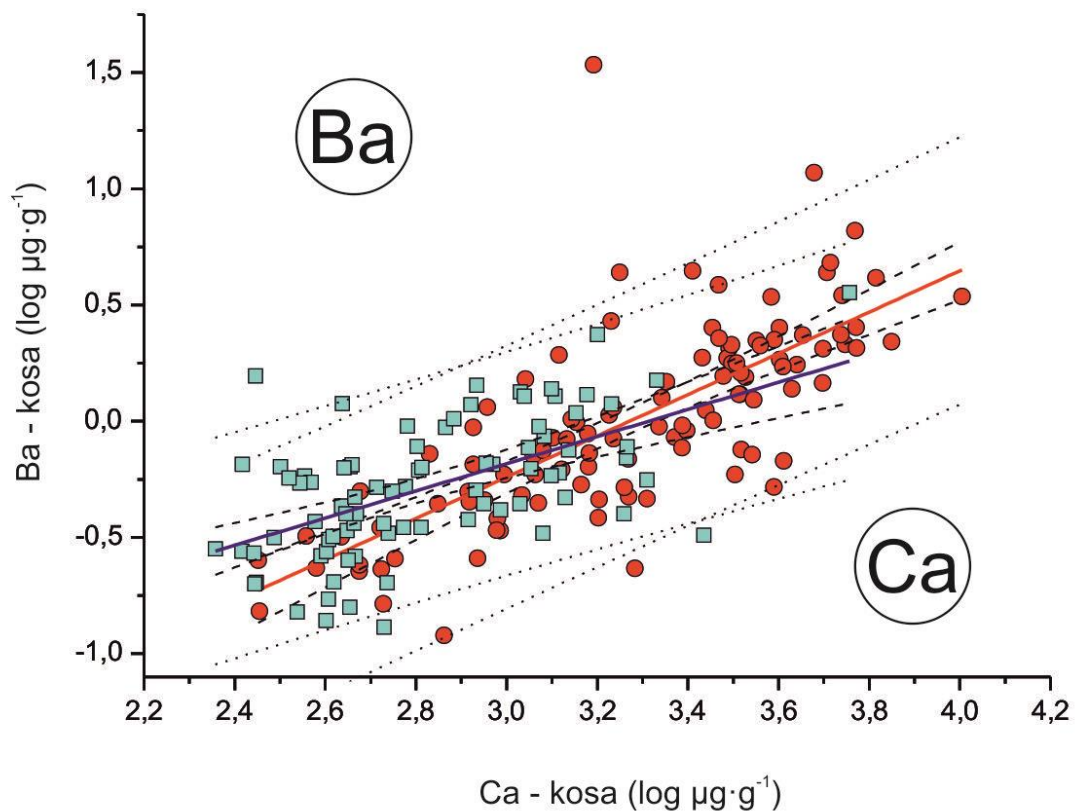
Tablica 8. Spearmanova korelacija ranga za žene u uzorcima krvi,  $n_{\text{♀}} = 88$ .

$\rho$  (ro) = koeficijent korelacije; p = razina značajnosti;  $p < 0,05$ ;  $p < \mathbf{0,01}$ ;  $p < \mathbf{0,001}$ .

		Dob	B	Ba	Ca	Mg	P	Si	Sr
B	$\rho$ (ro)	<b>,334</b>							
	p	<b>,004</b>							
Ba	$\rho$ (ro)	,243	<b>,462</b>						
	p	,037	<b>,000</b>						
Ca	$\rho$ (ro)	-,161	-,178	-,230					
	p	,171	,130	,049					
Mg	$\rho$ (ro)	<b>,400</b>	<b>,336</b>	,274	,276				
	p	<b>,000</b>	<b>,003</b>	,018	,017				
P	$\rho$ (ro)	,030	-,122	<b>-,320</b>	<b>,720</b>	,283			
	p	,800	,299	<b>,005</b>	<b>,000</b>	,015			
Si	$\rho$ (ro)	-,072	,241	,145	<b>,327</b>	,080	,221		
	p	,540	,039	,216	<b>,004</b>	,498	,059		
Sr	$\rho$ (ro)	-,165	,058	-,085	,000	-,230	,063	,117	
	p	,159	,625	,471	,997	,048	,592	,322	
Zn	$\rho$ (ro)	,182	,071	,126	-,064	<b>,381</b>	,126	-,099	,035
	p	,121	,549	,283	,585	<b>,001</b>	,286	,402	,765

### 5.3.3 Linearna korelacija

Tri najsnažnije korelacije varijabli u kosi (kalcija s barijem, magnezijem i stroncijem) (Slike 6-8), odnosno najsnažnija u punoj krvi (kalcija s fosforom) (Slika 10) dobivene faktorskom analizom i korelacijom ranga izdvojene su i prikazane grafički kao linearna korelacija. Uz njih prikazana je i korelacija kalcija i fosfora u kosi (Slika 9) kao najznačajnijih osteotropnih minerala, iako između njih nije dobivena očekivana značajna korelacija. Vrijednosti su logaritmirane da se može opisati linearna jednačba. Za svaki odnos određena je linearna funkcija s granicom pouzdanosti i granicom predikcije.



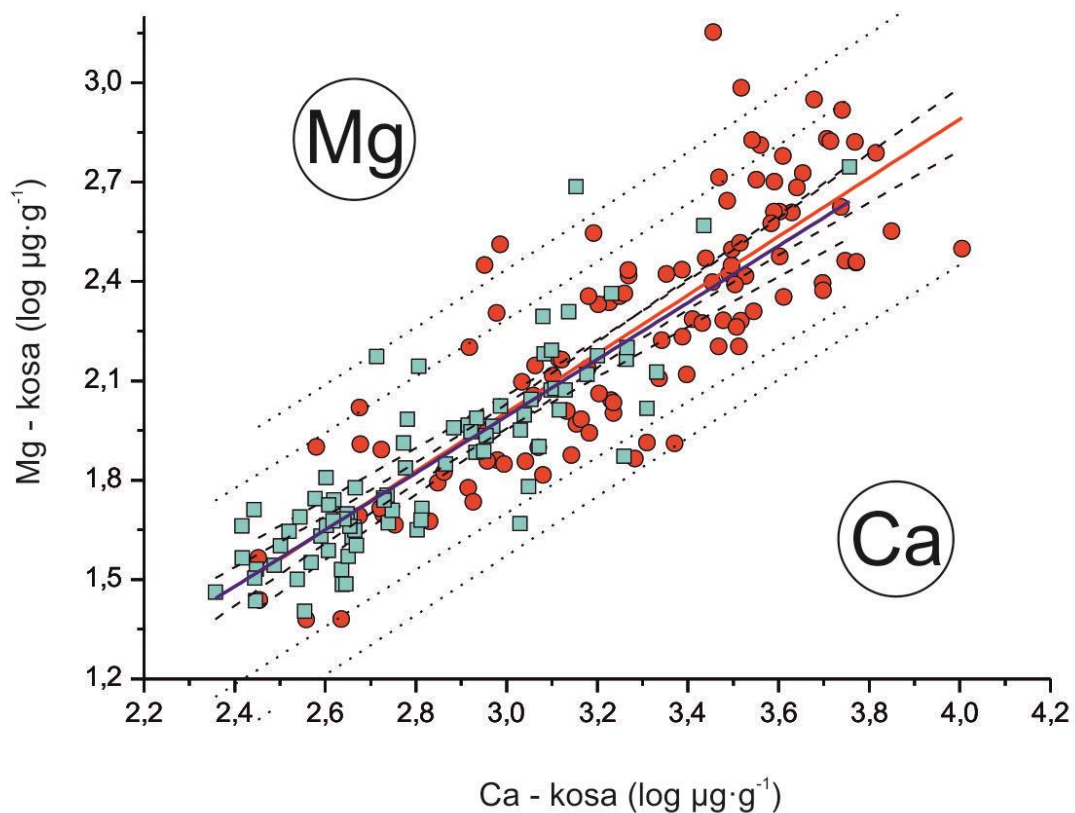
Slika 6. Linearna korelacija za Ca i Ba u kosi ( $Y = a \cdot X + b$ ).

■ muškarci (♂) ● žene (♀)

♂:  $Y = 0,584 \cdot X - 1,936$ ;  $r^2 = 0,314$ .

♀:  $Y = 0,888 \cdot X - 2,904$ ;  $r^2 = 0,540$ .

— Linearna funkcija  $Y = a \cdot X + b$ , - - - 0.95 granica pouzdanosti, ··· 0.95 granica predikcije.



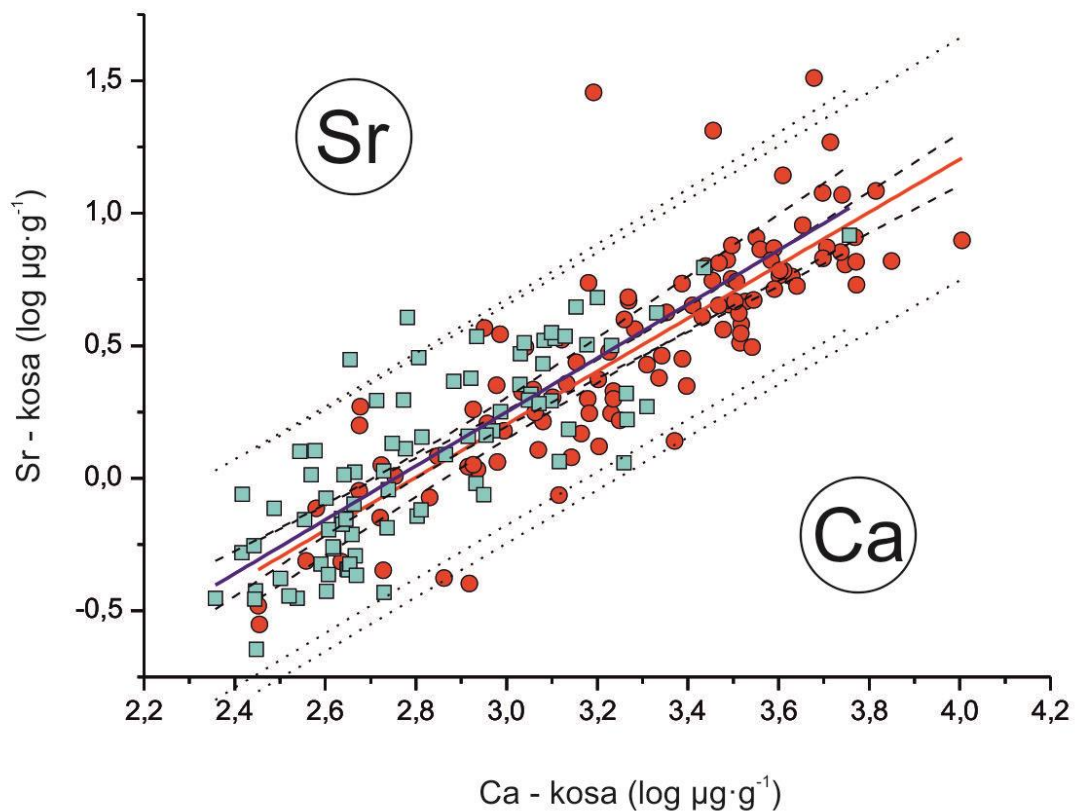
Slika 7. Linearna korelacija za Ca i Mg u kosi ( $Y = a \cdot X + b$ ).

■ muškarci (♂) ● žene (♀)

♂:  $Y = 0,857 \cdot X - 0,577$ ;  $r^2 = 0,731$ .

♀:  $Y = 0,885 \cdot X - 0,652$ ;  $r^2 = 0,667$ .

— Linearna funkcija  $Y = a \cdot X + b$ , - - - 0.95 granica pouzdanosti, ··· 0.95 granica predikcije.



Slika 8. Linearna korelacija za Ca i Sr u kosi ( $Y = a \cdot X + b$ ).

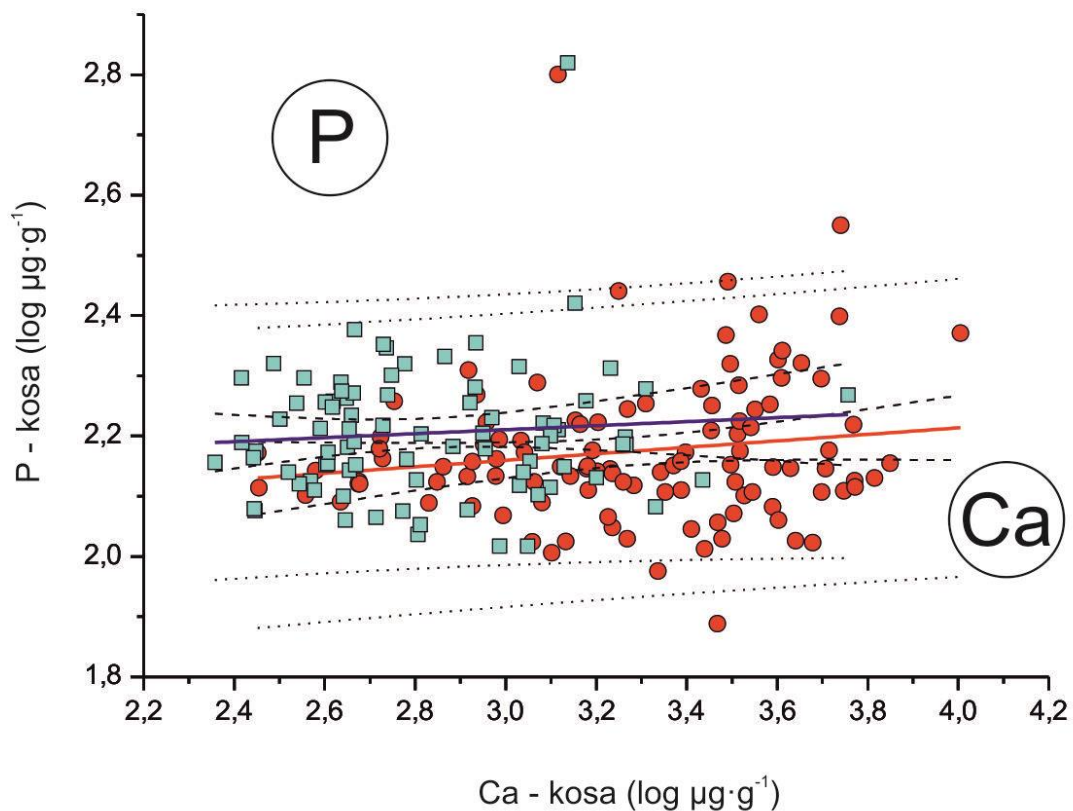
■ muškarci (♂) ● žene (♀)

♂:  $Y = 1,017 \cdot X - 2,800$ ;  $r^2 = 0,643$ .

♀:  $Y = 1,000 \cdot X - 2,797$ ;  $r^2 = 0,703$ .

— Linearna funkcija  $Y = a \cdot X + b$ , - - - 0.95 granica pouzdanosti, ··· 0.95 granica predikcije.





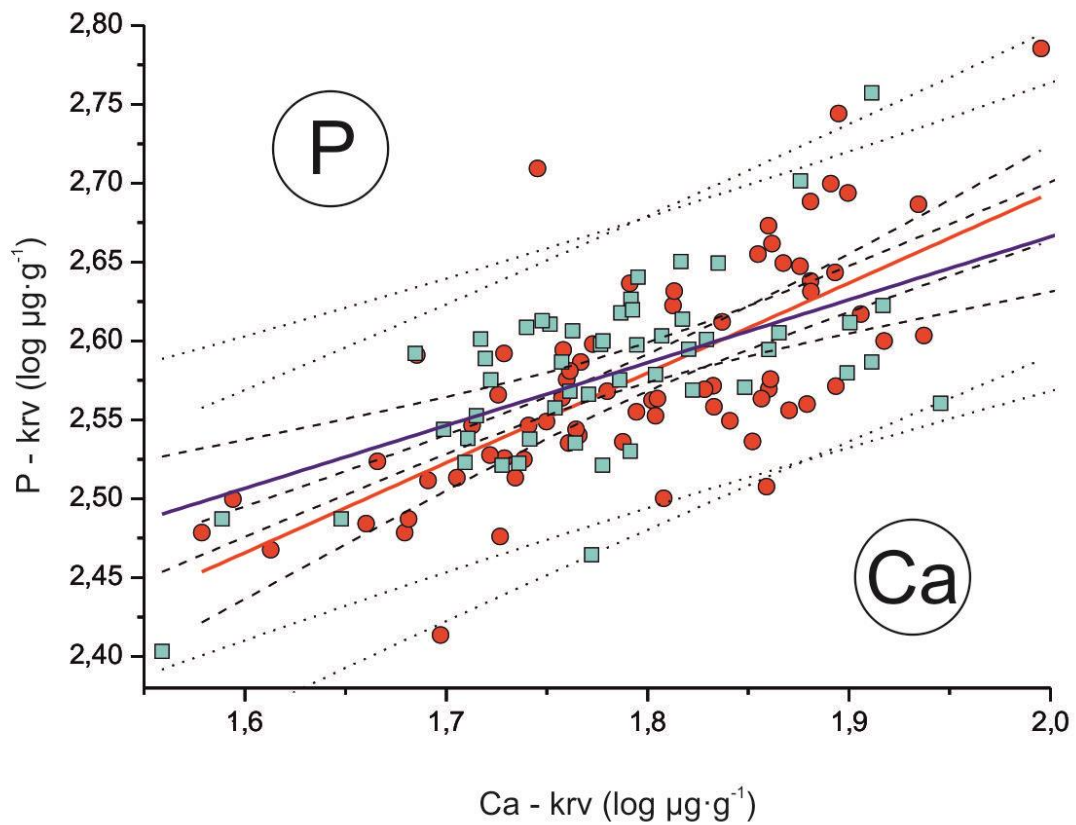
Slika 9. Linearna korelacija za Ca i P u kosi ( $Y = a \cdot X + b$ ).

■ muškarci (♂) ● žene (♀)

♂:  $Y = 0,033 \cdot X + 2,111$ ;  $r^2 = -0,005$ .

♀:  $Y = 0,054 \cdot X + 1,998$ ;  $r^2 = 0,014$ .

— Linearna funkcija  $Y = a \cdot X + b$ , - - - 0.95 granica pouzdanosti, ··· 0.95 granica predikcije.



Slika 10. Linearna korelacija za Ca i P u krvi ( $Y = a \cdot X + b$ ).

■ muškarci (♂) ● žene (♀)

♂:  $Y = 0,399 \cdot X + 1,869$ ;  $r^2 = 0,341$ .

♀:  $Y = 0,570 \cdot X + 1,553$ ;  $r^2 = 0,492$ .

— Linearna funkcija  $Y = a \cdot X + b$ , - - - 0.95 granica pouzdanosti, ··· 0.95 granica predikcije.

#### 5.4 Korelacija koncentracije pojedinih elemenata u kosi i krvi

Bivarijatnom analizom određen je međuodnos koncentracija elemenata u kosi i punoj krvi za pojedine ispitanike gdje su oba uzorka dostupna ( $n_{\text{♂+♀}} = 158$ ). Rabljene su dvije komplementarne statističke metode – računanje Pearsonova i Spearmanova koeficijenta korelacije. Razina značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ . Rezultati su prikazani u Tablici 9. Evidentno ne postoji zavisni odnos koncentracija niti jednog od testiranih elemenata u uzorkovanim biološkim indikatorima kose i krvi.

Tablica 9. Korelacija (bivarijatna analiza) između koncentracija pojedinih elemenata u kosi i punoj krvi analizirana metodama po Pearsonu i Spearmanu;  $n_{\text{♂+♀}} = 158$ ;  $p < 0,05$  je statistički značajan. Koeficijent korelacije ( $r$  i  $\rho$ ) rangirani su kao: 0,00-0,19 vrlo slabi, 0,20-0,39 slabi, 0,40-0,59 umjereni, 0,60-0,79 jaki i 0,80-1,00 vrlo jaki <sup>228</sup>.

Element	Koeficijent korelacije			
	Pearson ( $r$ )	$p$	Spearman ( $\rho$ )	$p$
B	,010	,913	,158	,075
Ba	-,054	,549	-,036	,686
Ca	-,062	,489	-,020	,822
Mg	-,036	,691	-,049	,584
P	,023	,795	,005	,959
Si	,097	,278	,038	,674
Sr	-,034	,705	,035	,699
Zn	,009	,923	,011	,900

## 5.5 Referentni intervali za određivanje adekvatnog nutritivnog statusa ili izloženosti elementima B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, Zn

Za grafički prikaz odnosno usporedbu distribucije frekvencija korištena je metoda derivata medijana. Metoda se sastoji od određivanja ukupnog medijana populacije ili medijana unutar skupine žena odnosno muškaraca, ovisno o tome postoji li razlika između skupina. Po definiciji, polovica populacije nalazi se iznad medijana (uzlazna grana medijana U), a druga polovica ispod medijana (silazna grana medijana D). Dakle, veličina populacije za središnji medijan  $M_0$  je zbroj populacije na uzlaznoj i silaznoj grani koje se nalaze oko središnje točke. Obje grane mogu se dalje dijeliti po istom principu – medijan na uzlaznoj grani  $U_0$  i medijan na silaznoj grani  $D_0$  („medijan medijana“) u sekvencu derivata medijana ( $U_{0,1,2,3,\dots,n-1,n}$  i  $D_{0,1,2,3,\dots,n-1,n}$ ). Za svaki derivat medijana u populaciji može se odrediti točna koncentracija elementa.

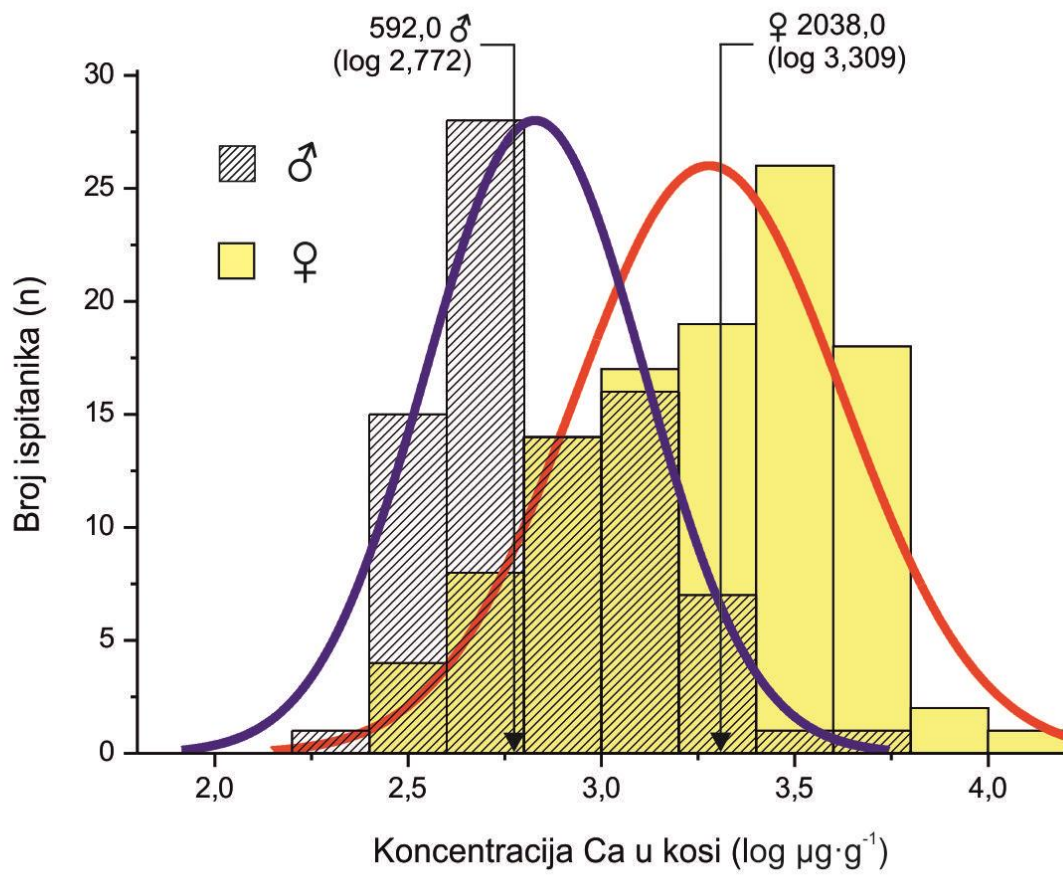
Za objašnjenje konkretnog rezultata distribucije frekvencija opisani su rezultati za kalcij u kosi. Izbor je na kalciju s obzirom na to da je, kako je ranije navedeno, glavni element koji izgrađuje kost, esencijalan je i ima jasno definiranu ulogu u organizmu. Ostali elementi prikazani su abecednim redom.

Koncentracija kalcija (Ca) u uzorcima kose varira od 227,6 do 10111,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  – kod žena od 282,9 do 10111,0 te kod muškaraca od 227,6 do 5706,1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Koristeći prethodno navedene metode ( $U$  test i  $\chi^2$  test) dokazana je statistički značajna razlika zbog čega su opisane dvije zasebne krivulje - odvojeno za muškarce i za žene. Vrijednosti derivata medijana prikazane su u Apendiksu 4a. Temeljem dobivenih vrijednosti opisana je sigmoidna krivulja distribucije frekvencija (Slika 11b). Da bi se kompenzirao rasap, kao i kod prikaza histograma, vrijednosti su

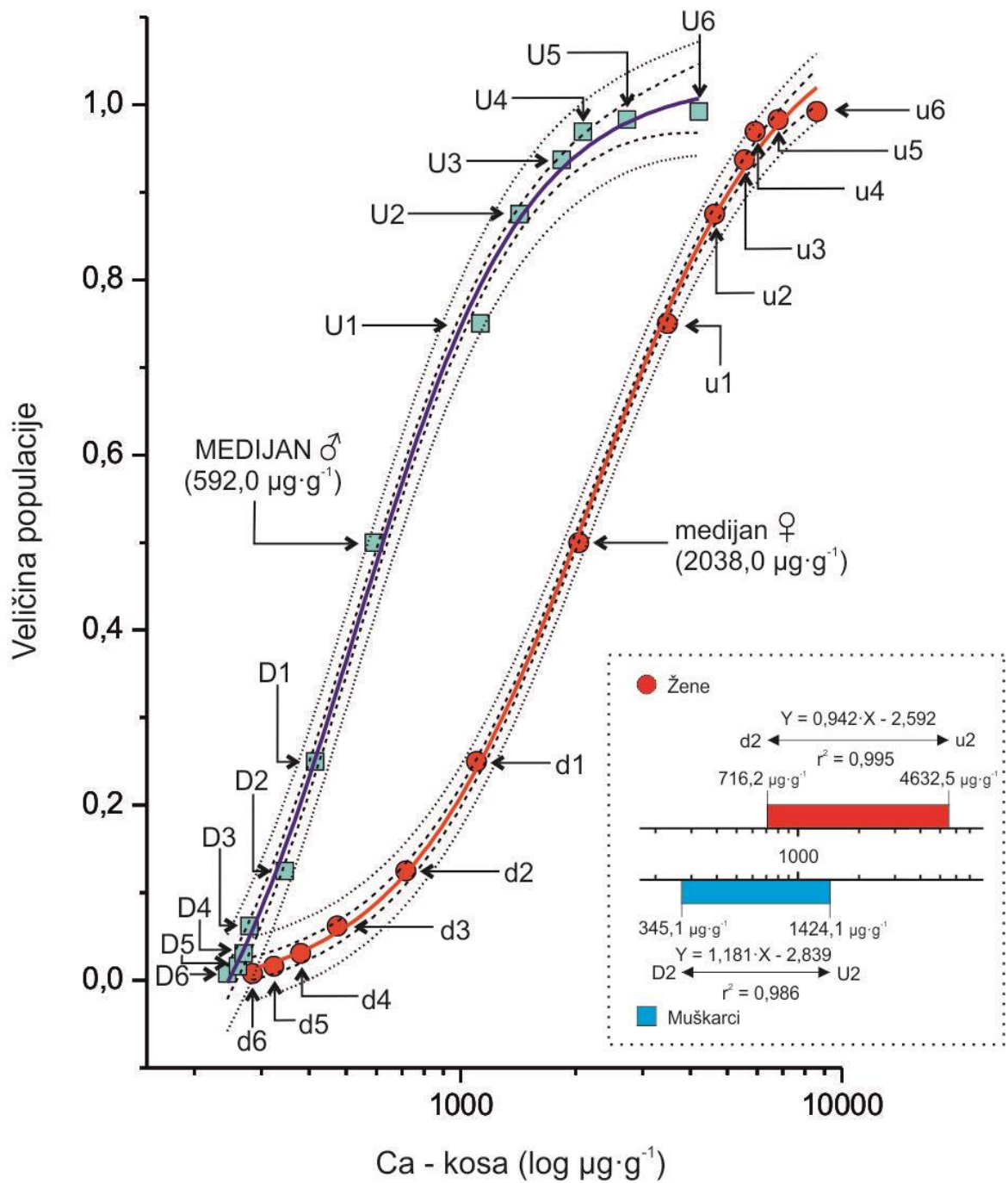
prikazane na logaritamskoj skali. Uočljiva su 3 područja – (1) donja horizontalna asimptota, (2) uzlazni linearni segment i (3) gornja horizontalna asimptota. Koristeći principe analize biološkog testiranja/uzorkovanja, može se smatrati da ista predstavljaju (1) manjak, (2) normalan raspon i (3) suvišak. Razlika između (1) i (2) izraženija je kod žena nego muškaraca.

Gledajući dobivenu logističku sigmoidnu krivulju vidimo da razina Ca ispod 345,1 kod muškaraca (D2) i ispod 716,2  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  kod žena (d2) predstavlja snižene vrijednosti u kosi što nužno odražava i manjak u statusu Ca u organizmu. Iznad navedenih vrijednosti postoji linearni trend akumulacije Ca koji je karakterističan za fiziološki mehanizam zasićenja<sup>229</sup>. Krivulja doseže plato i prelazi u horizontalni oblik kod muškaraca iznad koncentracije od 1424,1 (U2), dok kod žena iznad 4632,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (u2). Iznad tih vrijednosti za pretpostaviti je da se postiže zasićenje nakon čega slijede vrijednosti koje odgovaraju povišenima. Za linearni segment (za muškarce D2-U2, za žene d2-u2) opisana je funkcija linearne regresije  $Y = a + b \cdot X$  (Slika 11b – uokvireni segment dolje desno) s koeficijentom korelacije za muškarce  $r^2 = 0,986$  i za žene  $r^2 = 0,995$ .

Isti model kakav je opisan na Ca primijenjen je i na ostale istraživane elemente u oba biološka uzorka redom visine koncentracija (Slike 11b,c-18b,c). Na svakom grafu prikazana je i opisana funkcija za linearni segment (D2-U2, d2-u2) u donjem desnom kvadrantu. Vrijednosti derivata medijana prikazane su u apendiksu (Apendiks 4a-4h). Za svaki element u kosi zasebno je uz sigmoidnu krivulju prikazan i histogram sa krivuljom normalne raspodjele (Slike 11a-18a).

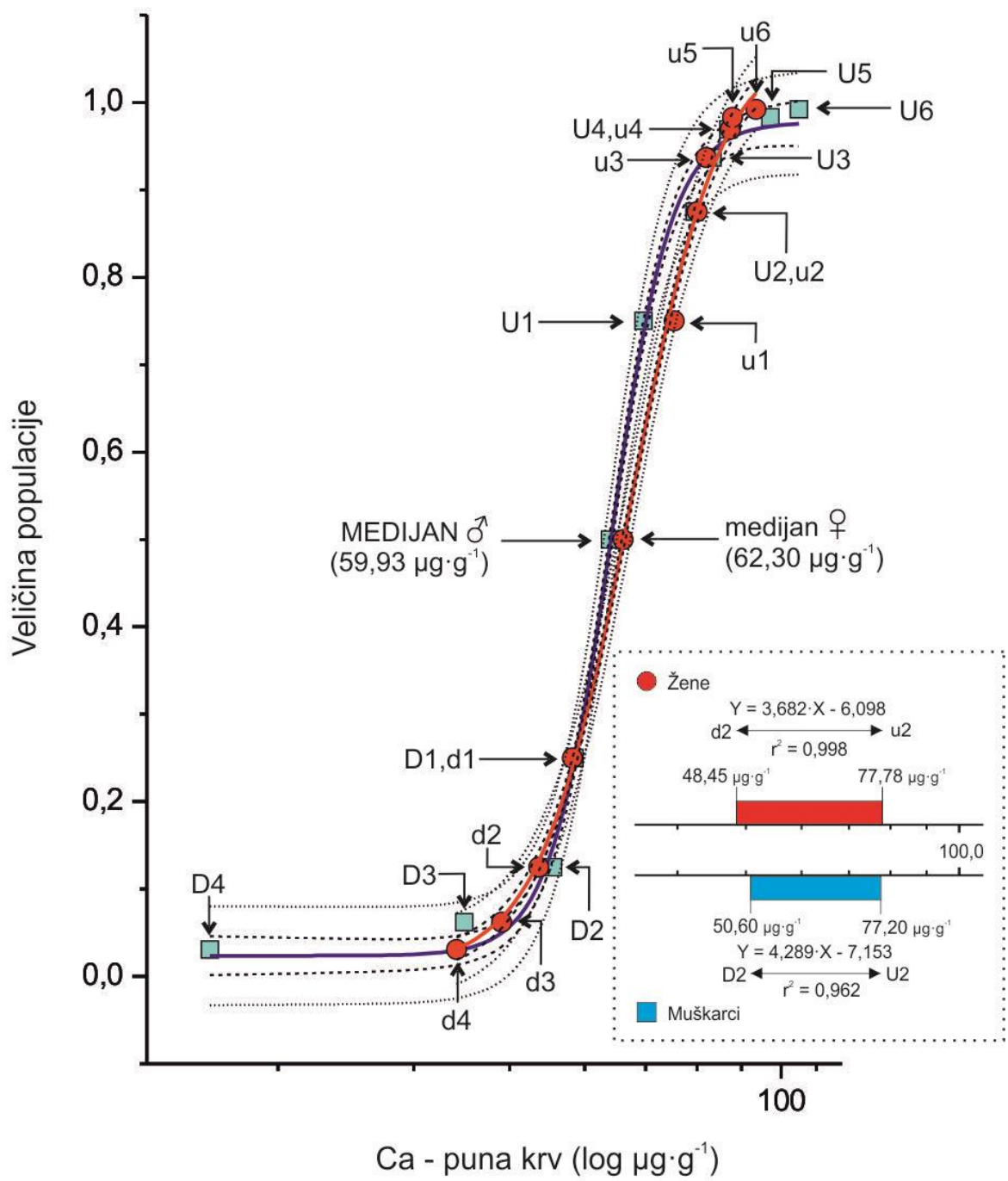


Slika 11a. Normalna raspodjela kalcija u kosi.



Slika 11b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ca u kosi.





Slika 11c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ca u krvi.

Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana.

■ Muškarci; ● Žene

D, U – Muškarci – silazni (D) i uzlazni (U) derivativi medijana; d, u – Žene – silazni (d) i uzlazni (u) derivati medijana. Apscisa (X-os) – stvarne vrijednosti koncentracije elemenata prikazane na logaritamskoj skali ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ); Ordinata (Y-os) – veličina (udio) populacije (1,0 = 100%).

— Logistička funkcija  $Y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (X/X_0)^p)$ , - - - 0.95 granica pouzdanosti, ... 0.95 granica predikcije. Kvadrant (dolje desno): Raspon linearne saturacije odvojeno za ♂ i ♀ (logaritamska skala).

Vidjeti Apendiks 3 za model i Apendiks 4 za vrijednosti.

Slika 11a. Histogram koncentracija kalcija u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). --- Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa: logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika (n).

Slika 11b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ca u kosi.

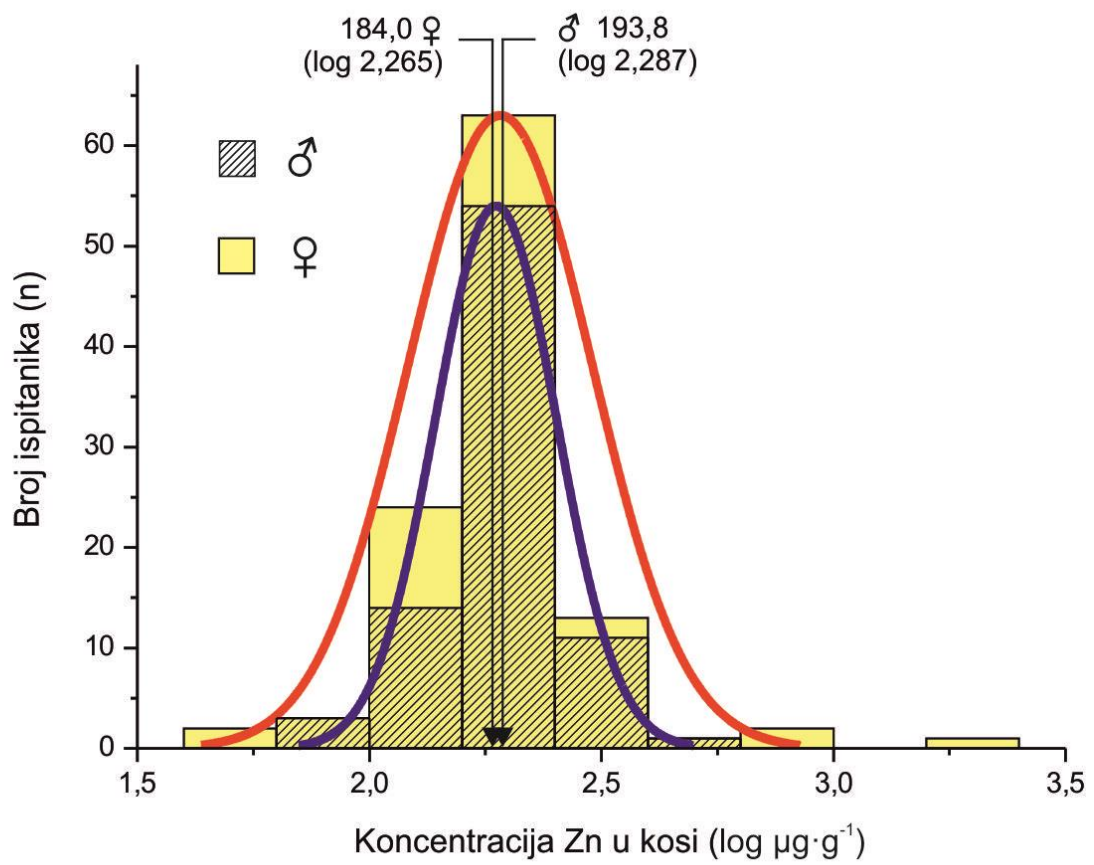
Muškarci:  $Y = 1,029 + (-0,232 + 1,029)/(1 + (X/528,4)^{1,949})$ ,  $r^2 = 0,997$ ;

Žene:  $Y = 1,115 + (-0,017 + 1,115)/(1 + (X/2204,4)^{1,750})$ ,  $r^2 = 0,999$ .

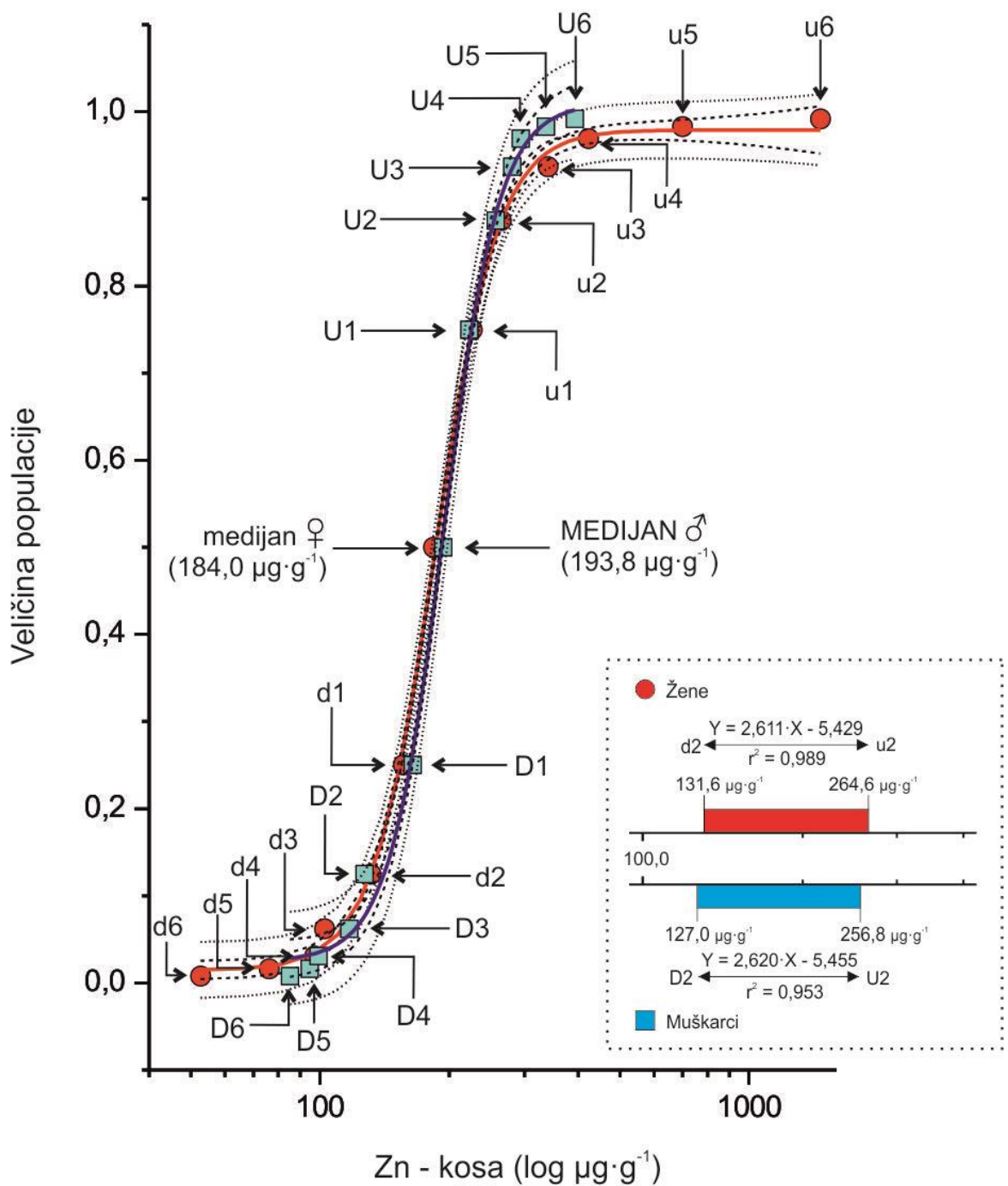
Slika 11c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ca u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,978 + (0,024 + 0,978)/(1 + (X/60,1)^{10,973})$ ,  $r^2 = 0,997$ ;

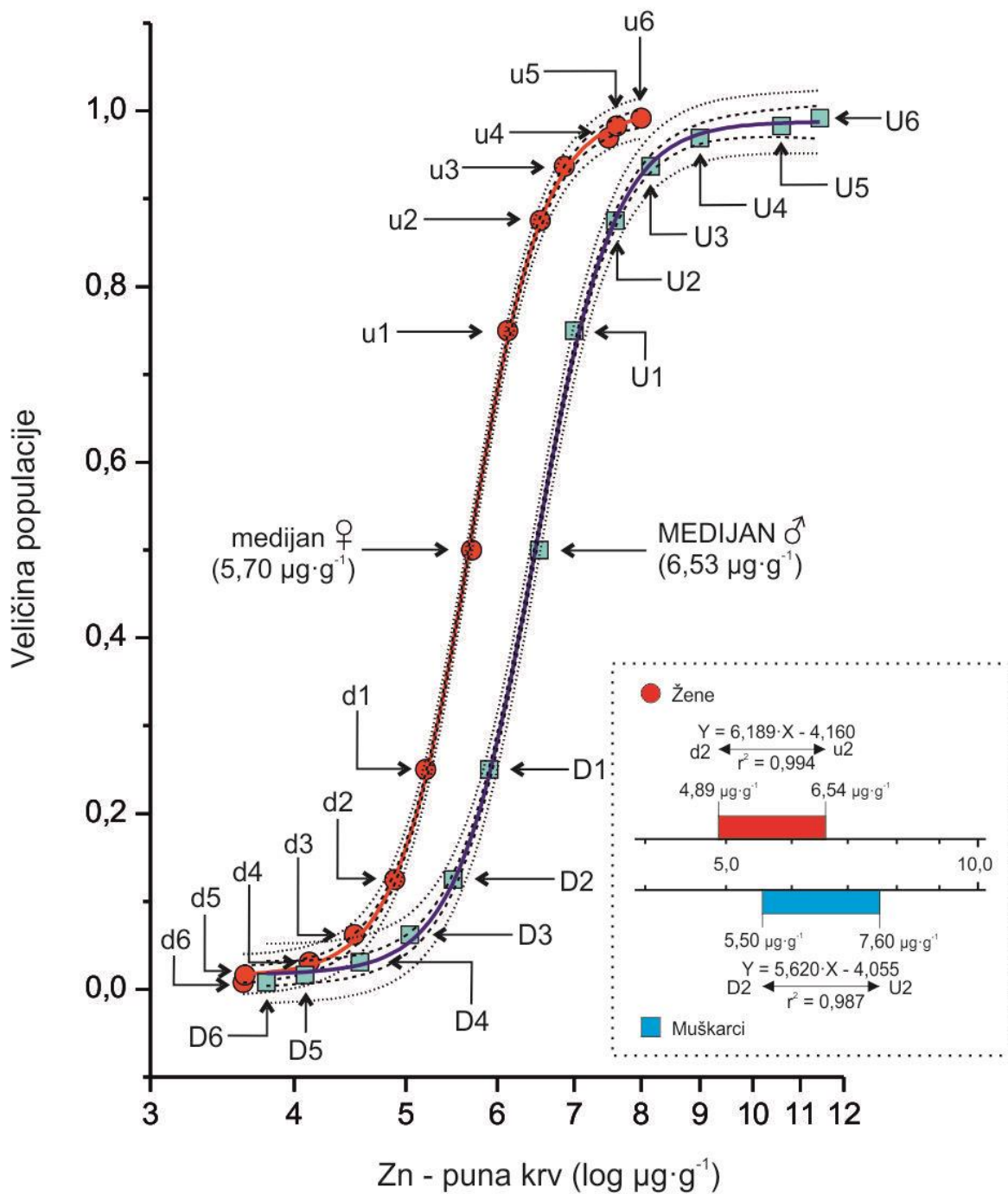
Žene:  $Y = 1,072 + (0,010 + 1,072)/(1 + (X/63,7)^{7,439})$ ,  $r^2 = 0,998$ .



Slika 12a. Normalna raspodjela cinka u kosi.



Slika 12b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Zn u kosi.



Slika 12c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Zn u krvi.

Slika 12a. Histogram koncentracija cinka u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). ---  
Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su  
vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa:  
logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika  
(n).

Slika 12b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Zn u kosi.

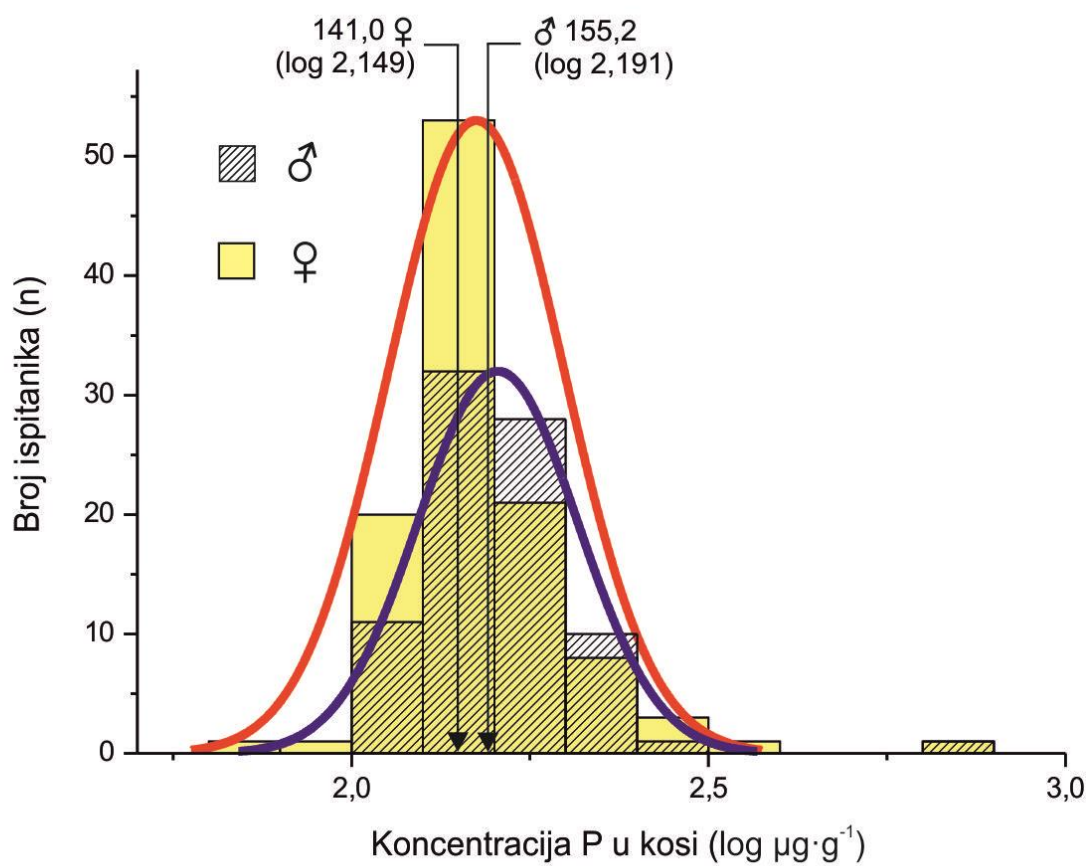
Muškarci:  $Y = 1,010 + (0,025 + 1,010)/(1 + (X/194,2)^{6,811})$ ,  $r^2 = 0,997$ ;

Žene:  $Y = 0,979 + (0,014 + 0,979)/(1 + (X/185,7)^{5,949})$ ,  $r^2 = 0,999$ .

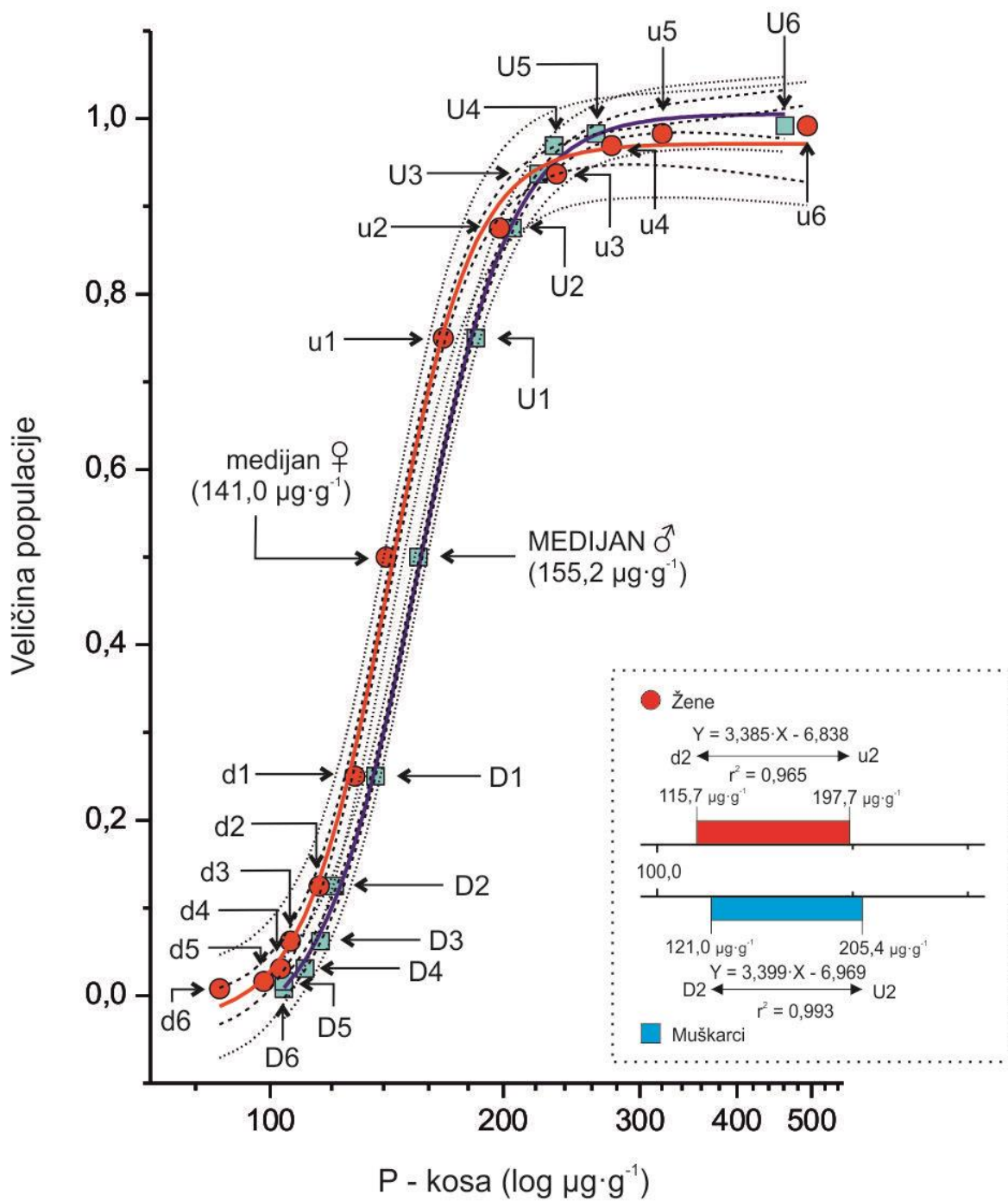
Slika 12c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Zn u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,988 + (0,017 + 0,988)/(1 + (X/6,480)^{12,825})$ ,  $r^2 = 0,999$ ;

Žene:  $Y = 1,001 + (0,015 + 1,001)/(1 + (X/5,686)^{13,624})$ ,  $r^2 = 0,999$ .

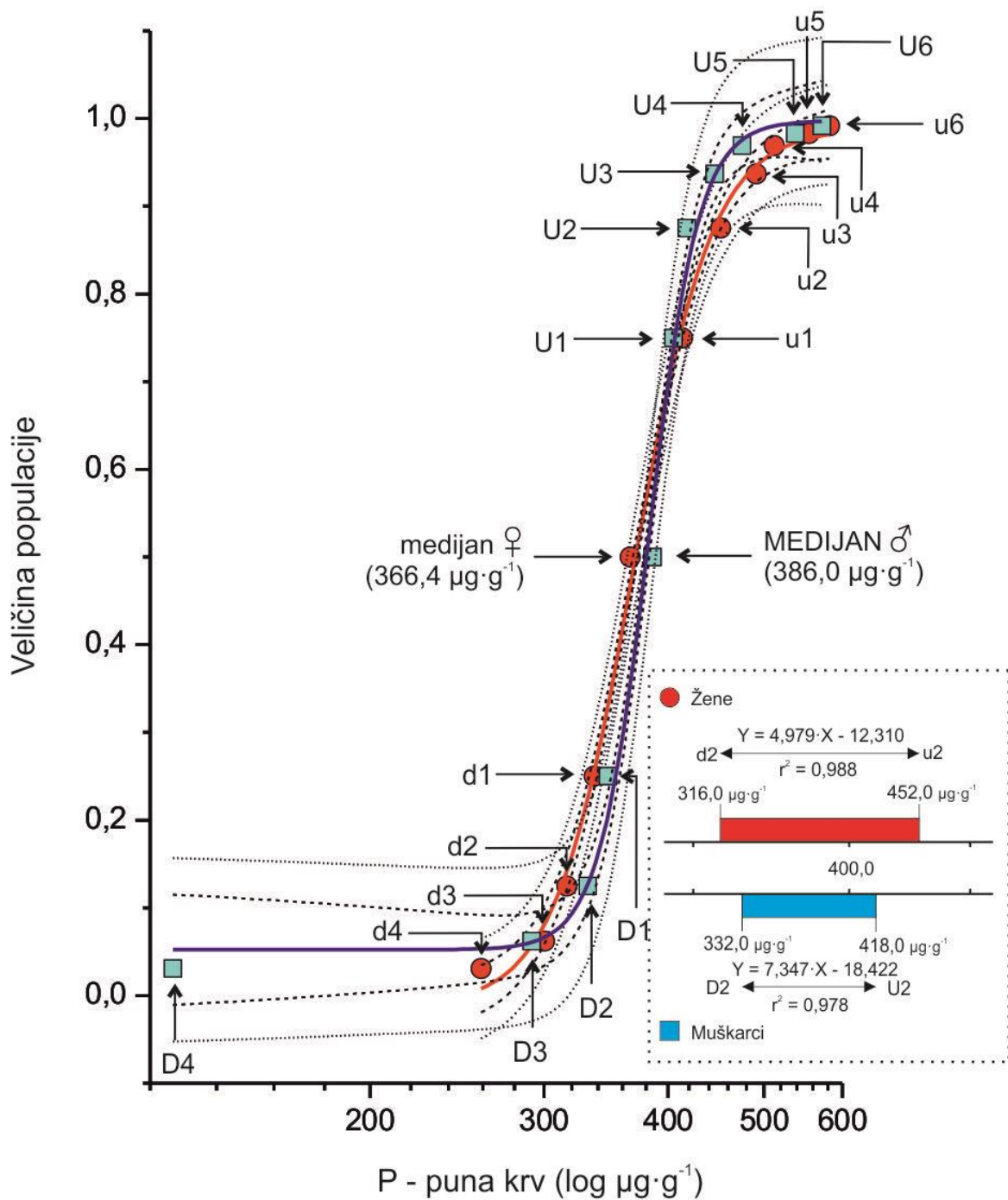


Slika 13a. Normalna raspodjela fosfora u kosi.



Slika 13b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za P u kosi.





Slika 13c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za P u krvi.

Slika 13a. Histogram koncentracija fosfora u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). ---  
Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su  
vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa:  
logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika  
(n).

Slika 13b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za P u kosi.

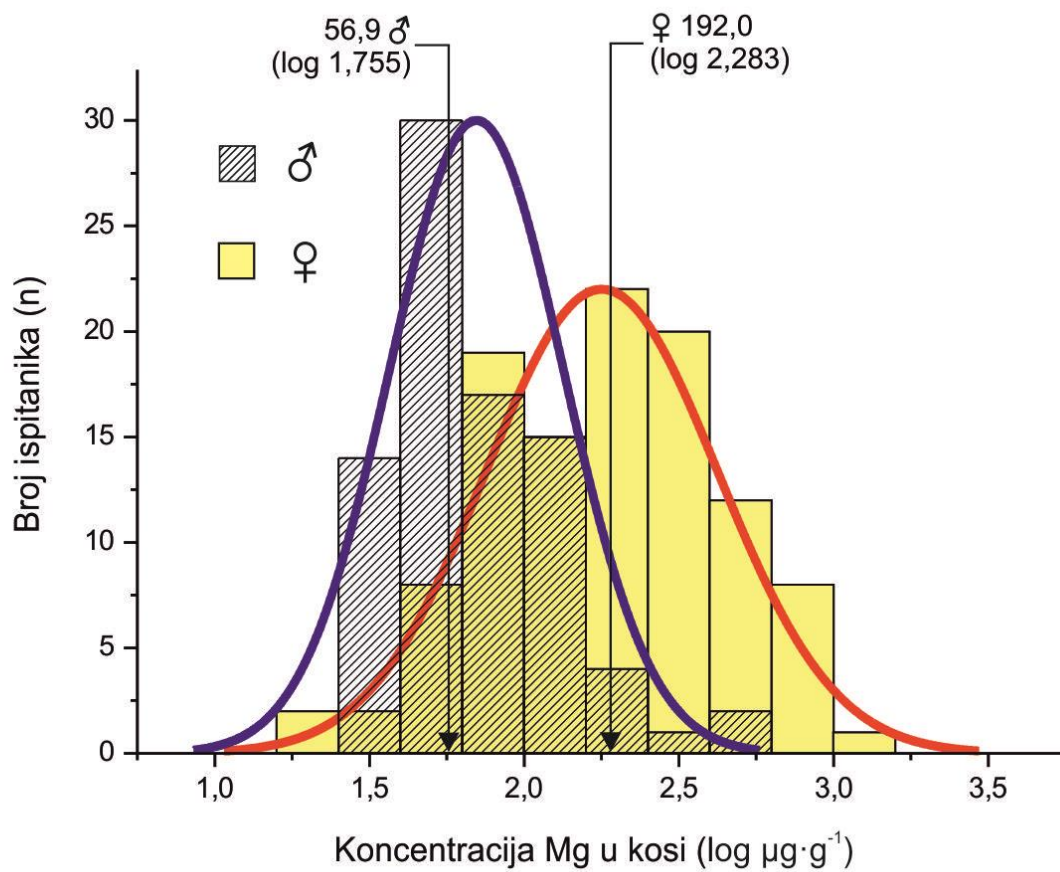
Muškarci:  $Y = 1,005 + (-0,052 + 1,005)/(1 + (X/154,5)^{7,061})$ ,  $r^2 = 0,999$ ;

Žene:  $Y = 0,971 + (-0,030 + 0,971)/(1 + (X/142,1)^{7,945})$ ,  $r^2 = 0,997$ .

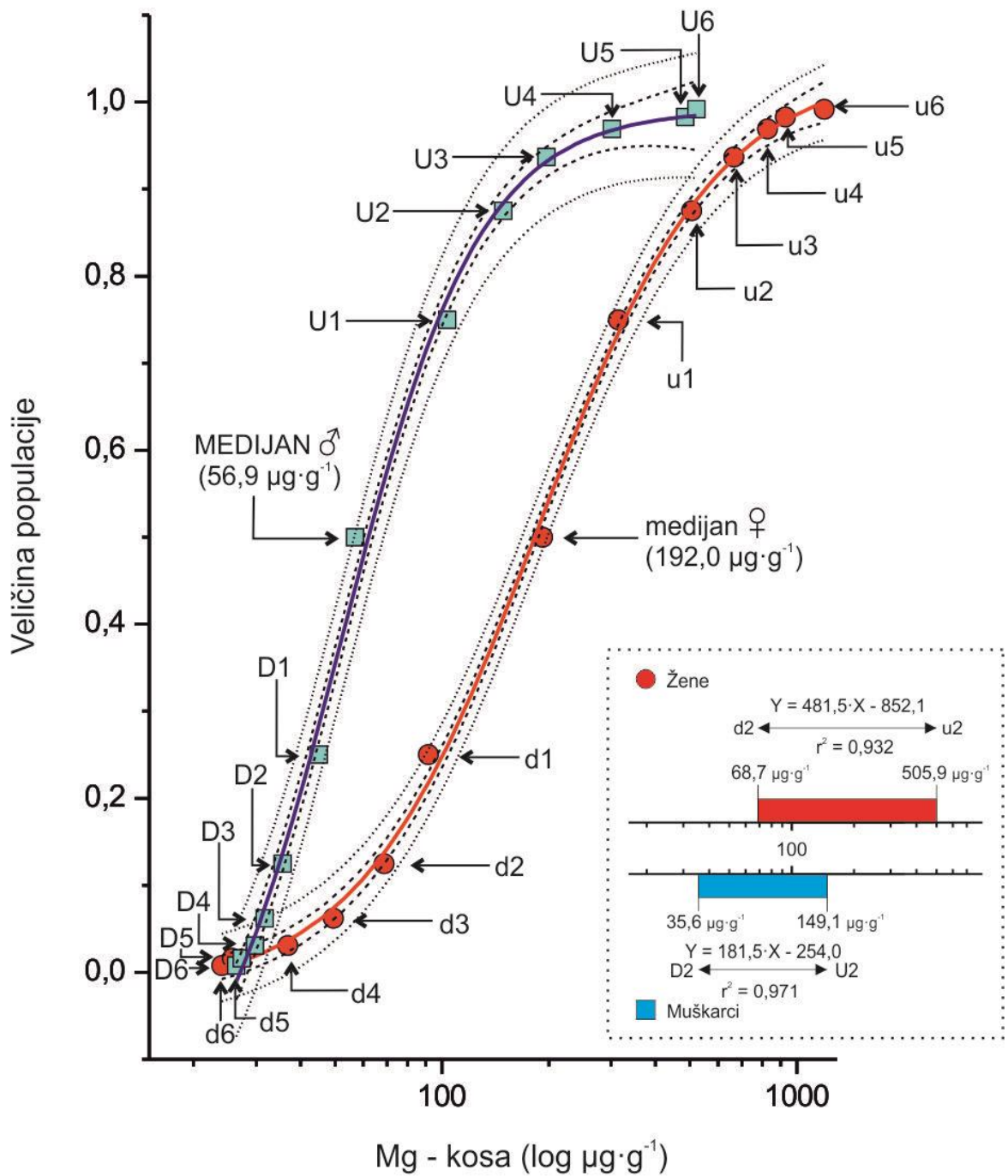
Slika 13c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za P u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,998 + (0,052 + 0,998)/(1 + (X/382,7)^{17,251})$ ,  $r^2 = 0,993$ ;

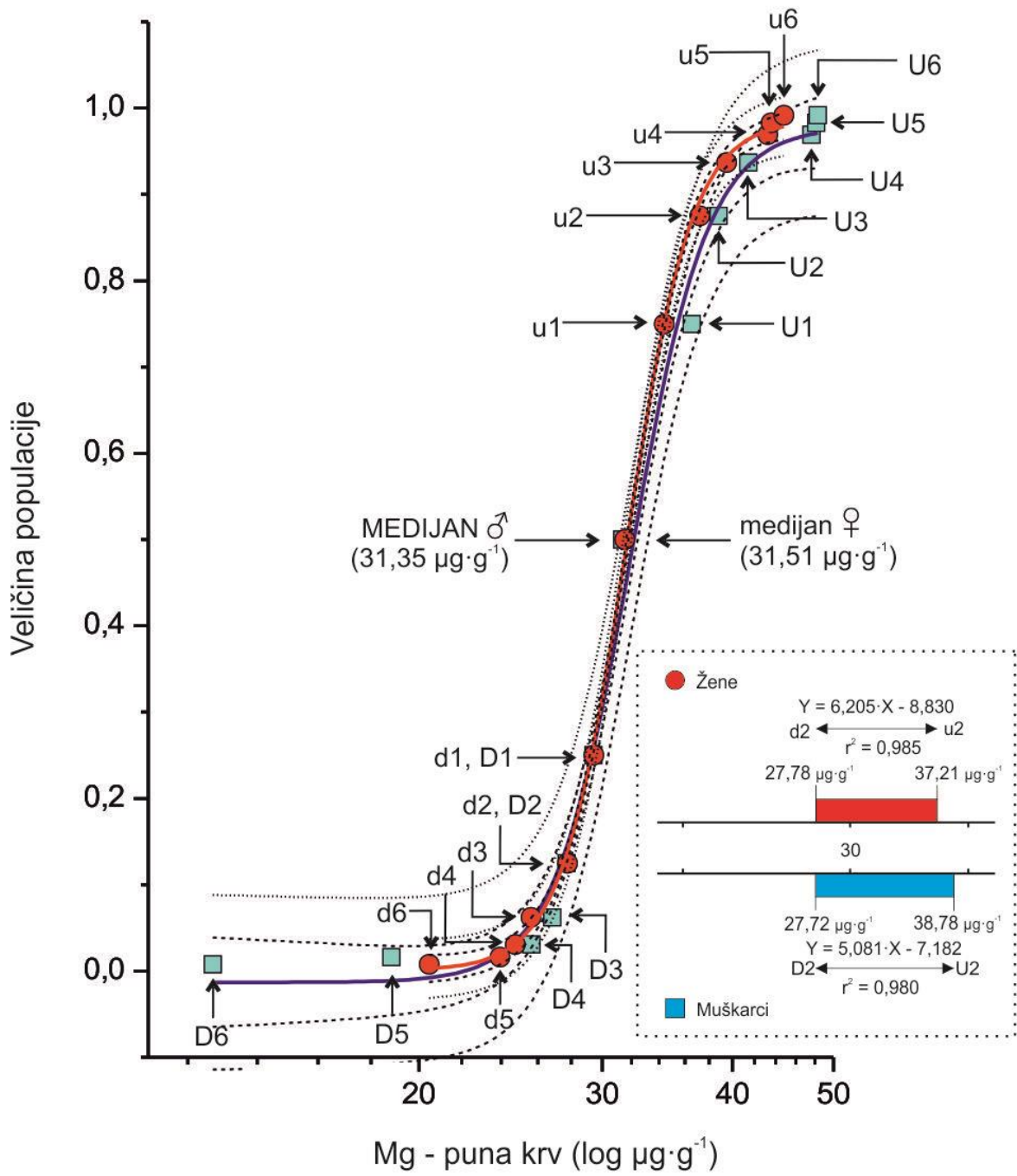
Žene:  $Y = 0,989 + (-0,013 + 0,989)/(1 + (X/369,4)^{10,939})$ ,  $r^2 = 0,997$ .



Slika 14a. Normalna raspodjela magnezija u kosi.



Slika 14b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Mg u kosi.



Slika 14c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Mg u krvi.

Slika 14a. Histogram koncentracija magnezija u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). --  
- Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa: logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika (n).

Slika 14b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Mg u kosi.

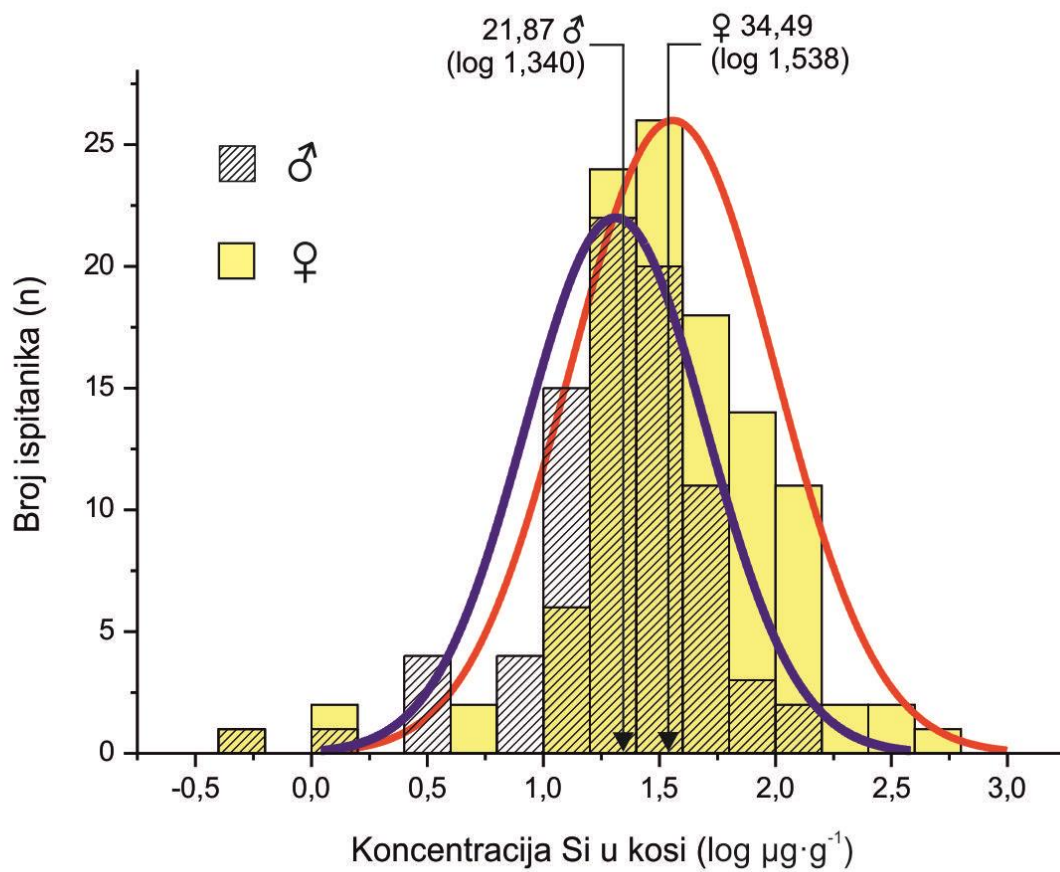
Muškarci:  $Y = 0,992 + (-0,233 + 0,992)/(1 + (X/51,9)^{2,220})$ ,  $r^2 = 0,996$ ;

Žene:  $Y = 1,041 + (-0,025 + 1,041)/(1 + (X/185,7)^{1,729})$ ,  $r^2 = 0,999$ .

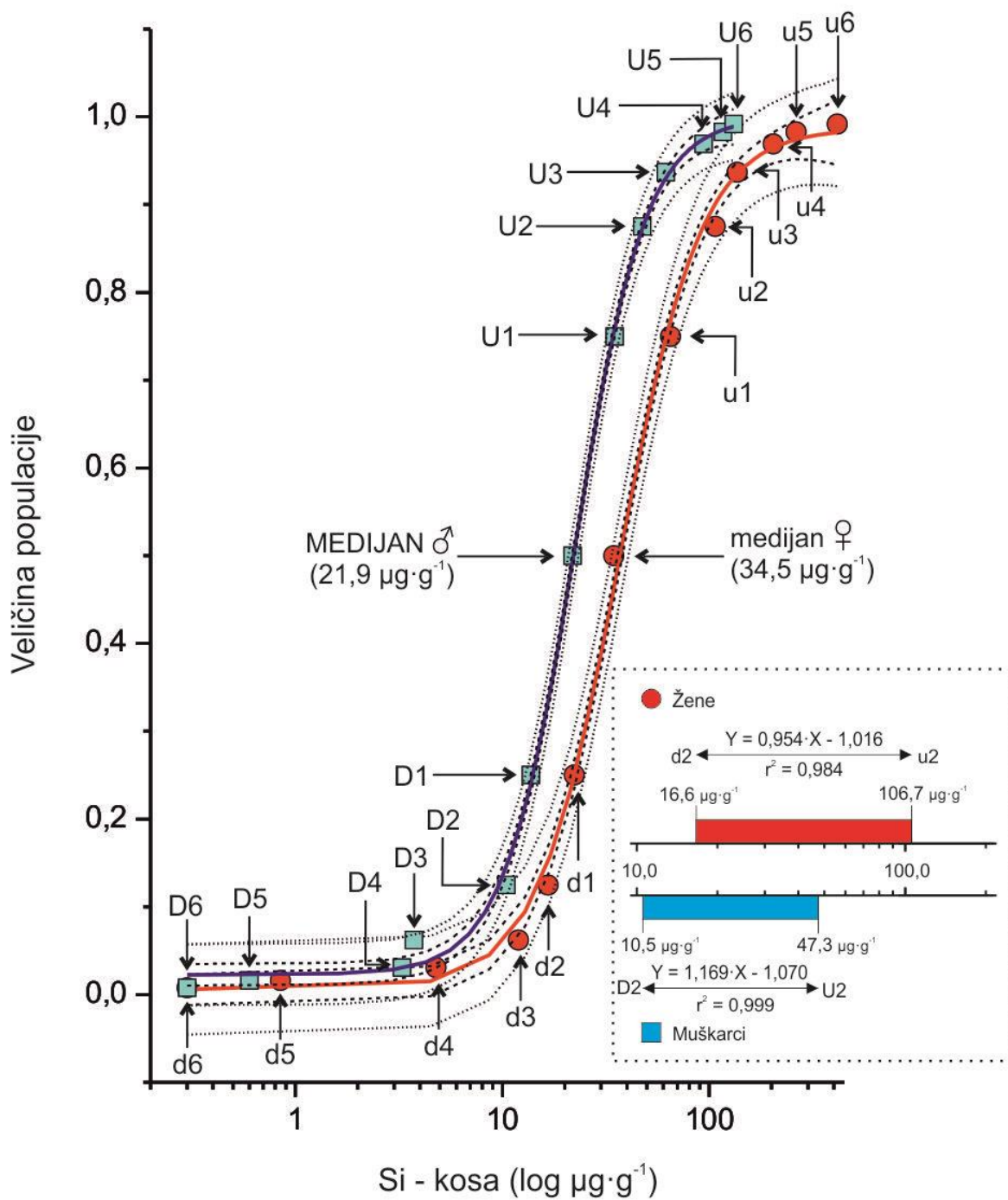
Slika 14c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Mg u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,979 + (0,013 + 0,979)/(1 + (X/31,9)^{11,723})$ ,  $r^2 = 0,992$ ;

Žene:  $Y = 0,986 + (0,0006 + 0,986)/(1 + (X/31,65)^{13,938})$ ,  $r^2 = 0,999$ .

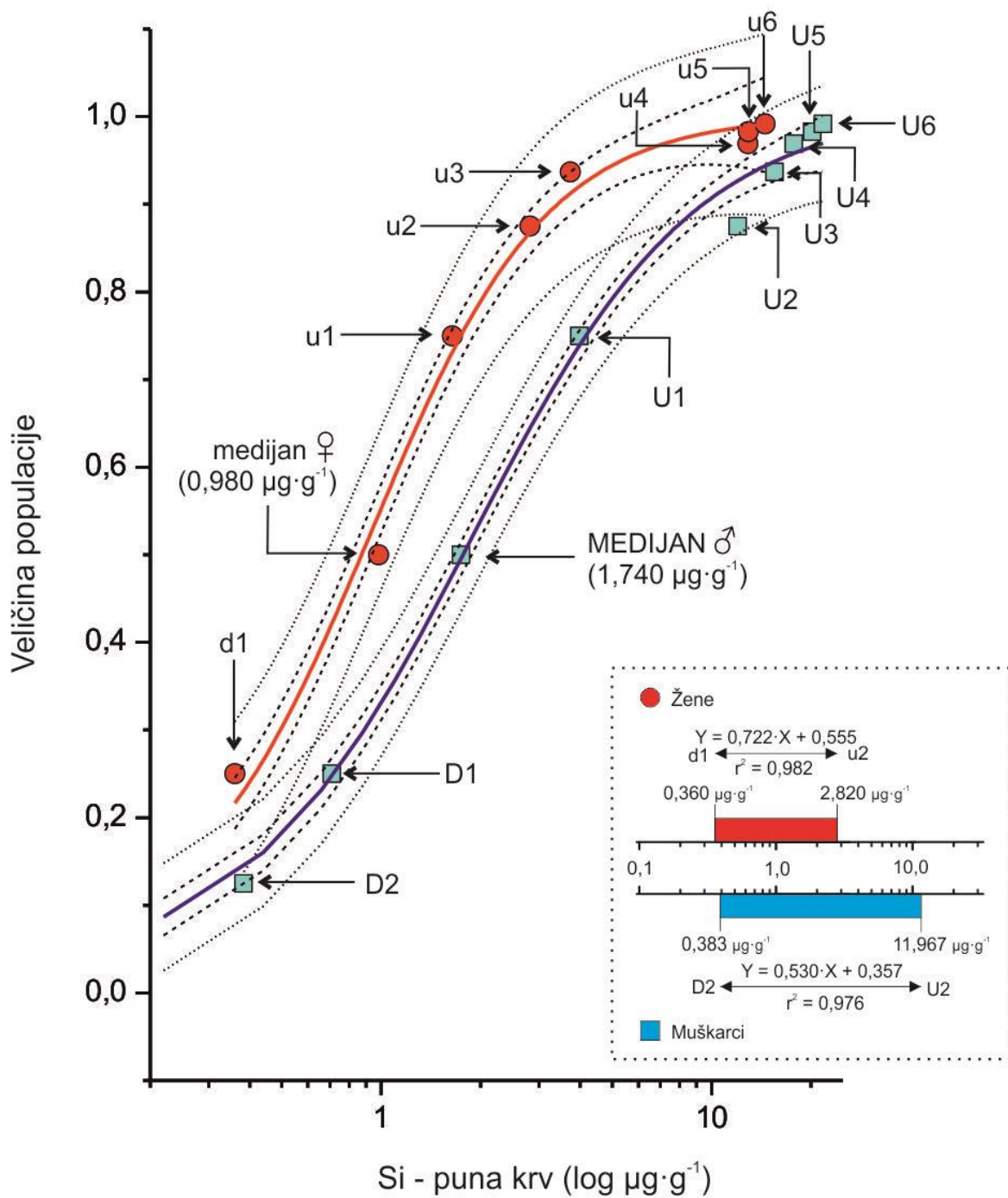


Slika 15a. Normalna raspodjela silicija u kosi.



Slika 15b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Si u kosi.





Slika 15c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Si u krvi.

Slika 15a. Histogram koncentracija silicija u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). ---  
Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su  
vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa:  
logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika  
(n).

Slika 15b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Si u kosi.

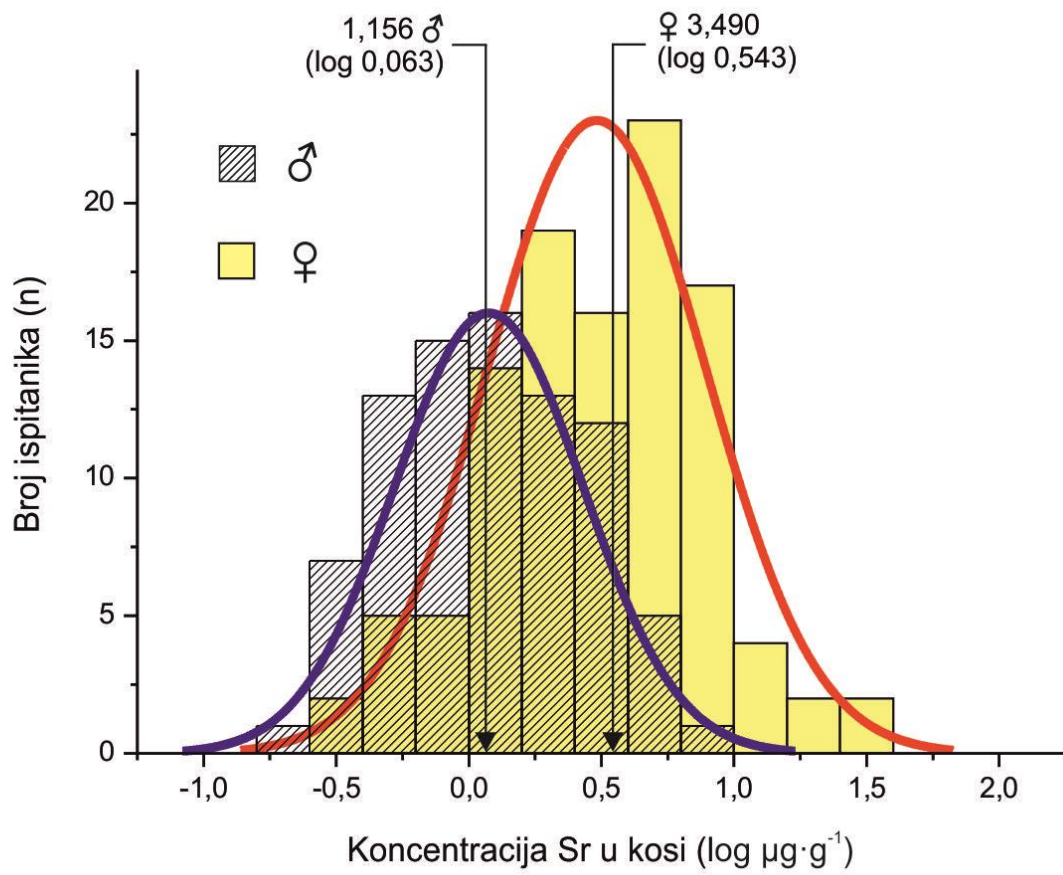
Muškarci:  $Y = 1,000 + (0,023 + 1,000)/(1 + (X/22,46)^{2,540})$ ,  $r^2 = 0,999$ ;

Žene:  $Y = 0,987 + (0,006 + 0,987)/(1 + (X/36,80)^{2,197})$ ,  $r^2 = 0,997$ .

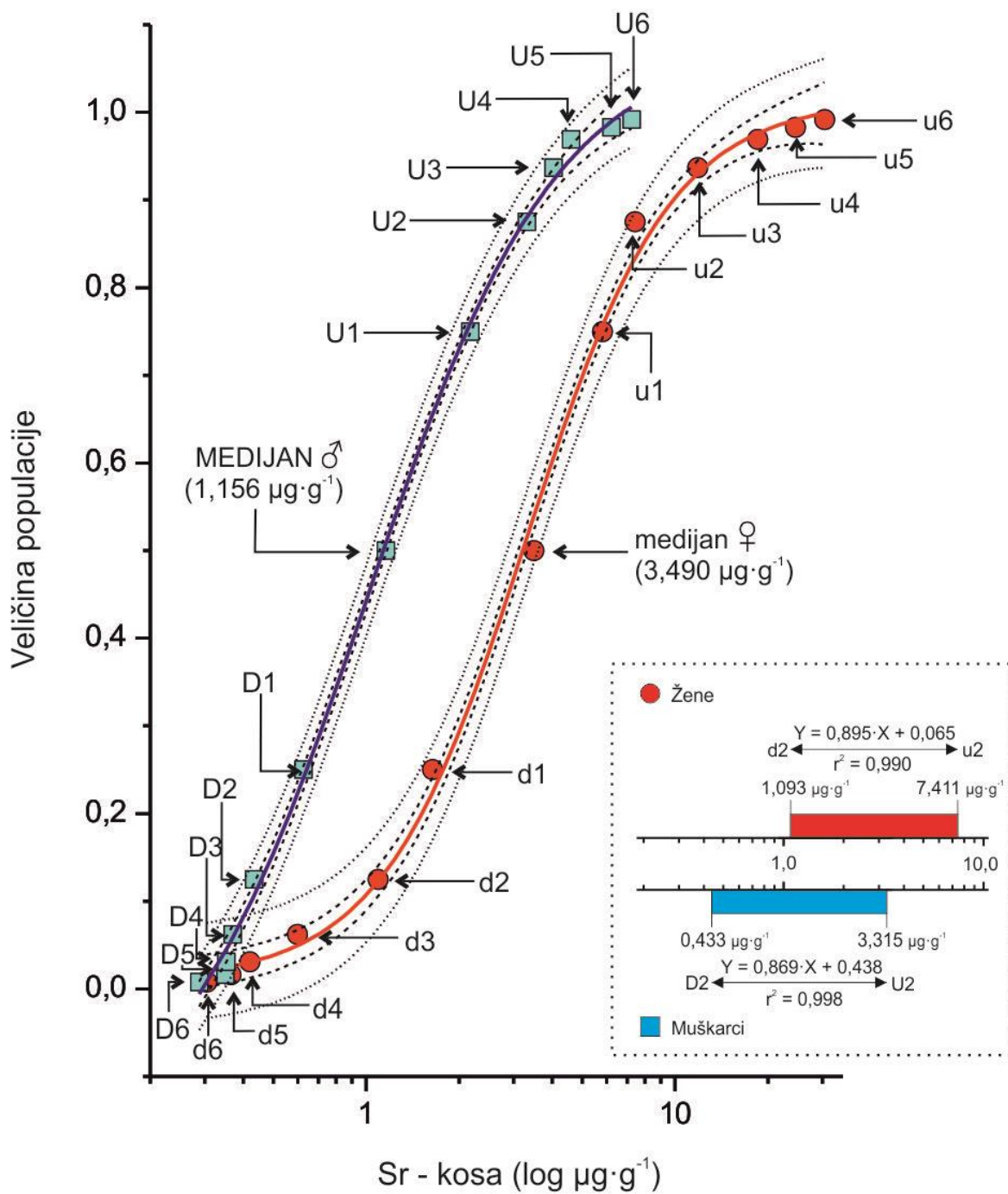
Slika 15c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Si u krvi.

Muškarci:  $Y = 1,011 + (0,027 + 1,011)/(1 + (X/1,877)^{1,279})$ ,  $r^2 = 0,996$ ;

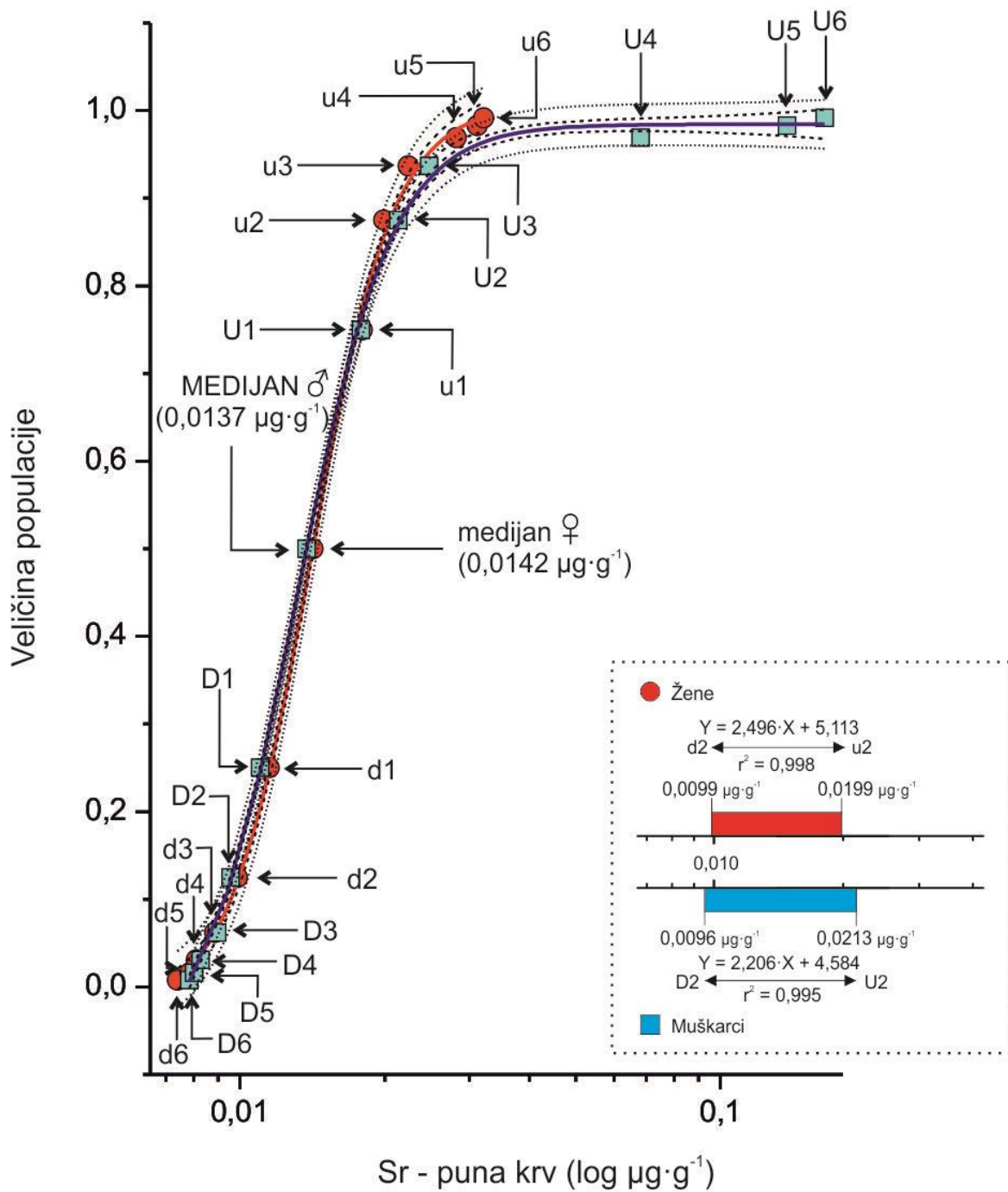
Žene:  $Y = 1,002 + (0,052 + 1,002)/(1 + (X/0,934)^{1,637})$ ,  $r^2 = 0,992$ .



Slika 16a. Normalna raspodjela stroncija u kosi.



Slika 16b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Sr u kosi.



Slika 16c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Sr u krvi.

Slika 16a. Histogram koncentracija stroncija u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). --- Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa: logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika (n).

Slika 16b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Sr u kosi.

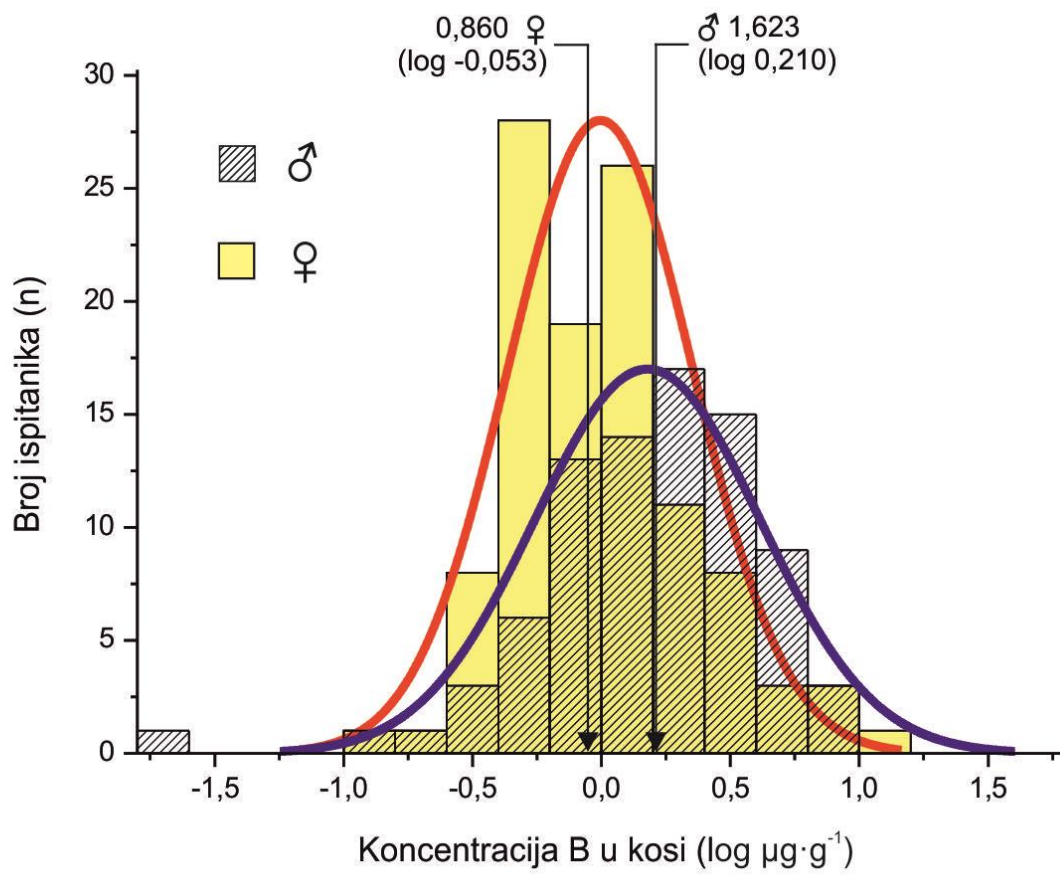
Muškarci:  $Y = 1,081 + (-0,196 + 1,081)/(1 + (X/0,999)^{1,401})$ ,  $r^2 = 0,998$ ;

Žene:  $Y = 1,014 + (0,009 + 1,014)/(1 + (X/3,294)^{1,868})$ ,  $r^2 = 0,997$ .

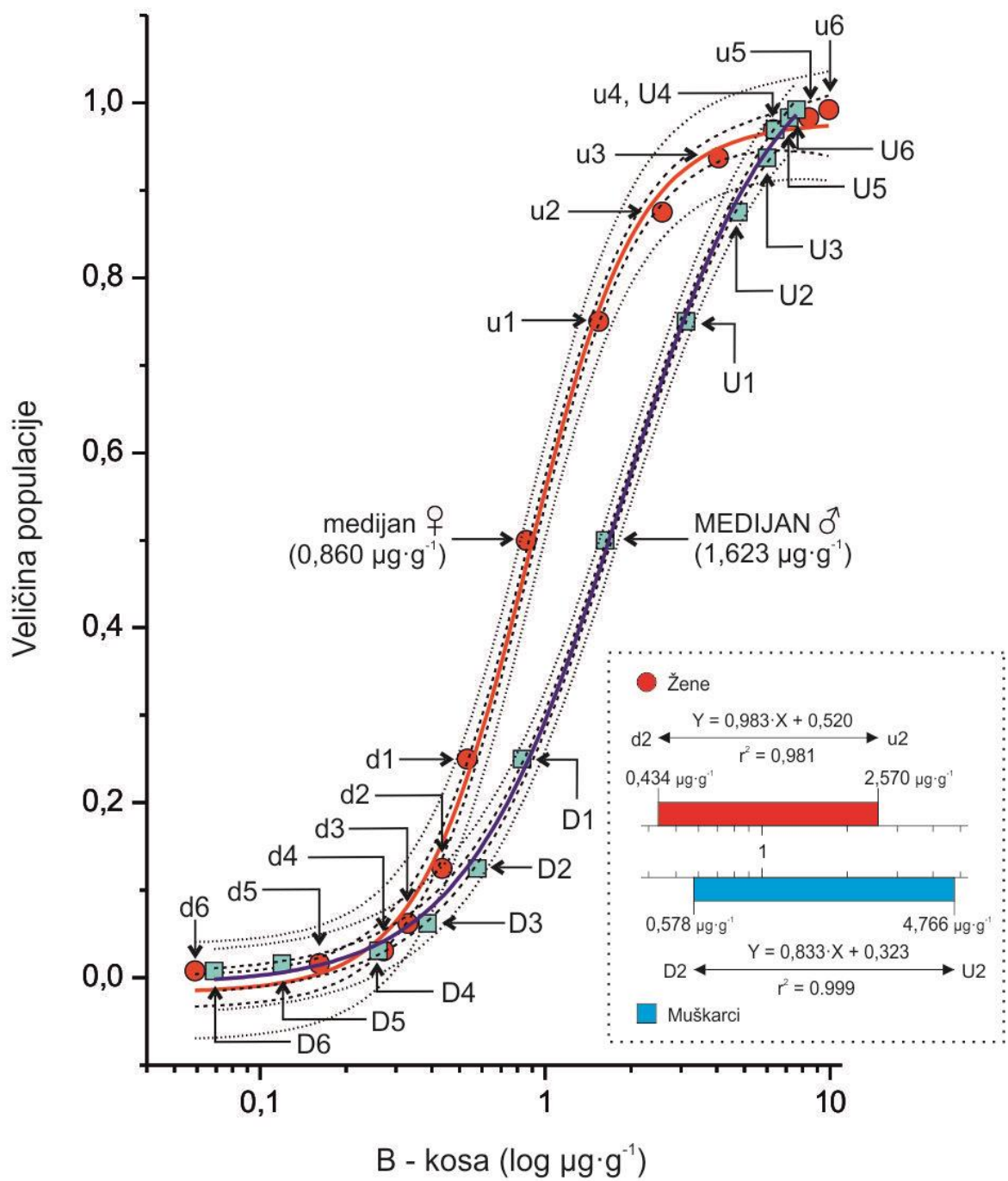
Slika 16c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Sr u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,984 + (-0,094 + 0,984)/(1 + (X/0,013)^{4,410})$ ,  $r^2 = 0,999$ ;

Žene:  $Y = 1,008 + (-0,031 + 1,008)/(1 + (X/0,014)^{5,047})$ ,  $r^2 = 0,999$ .

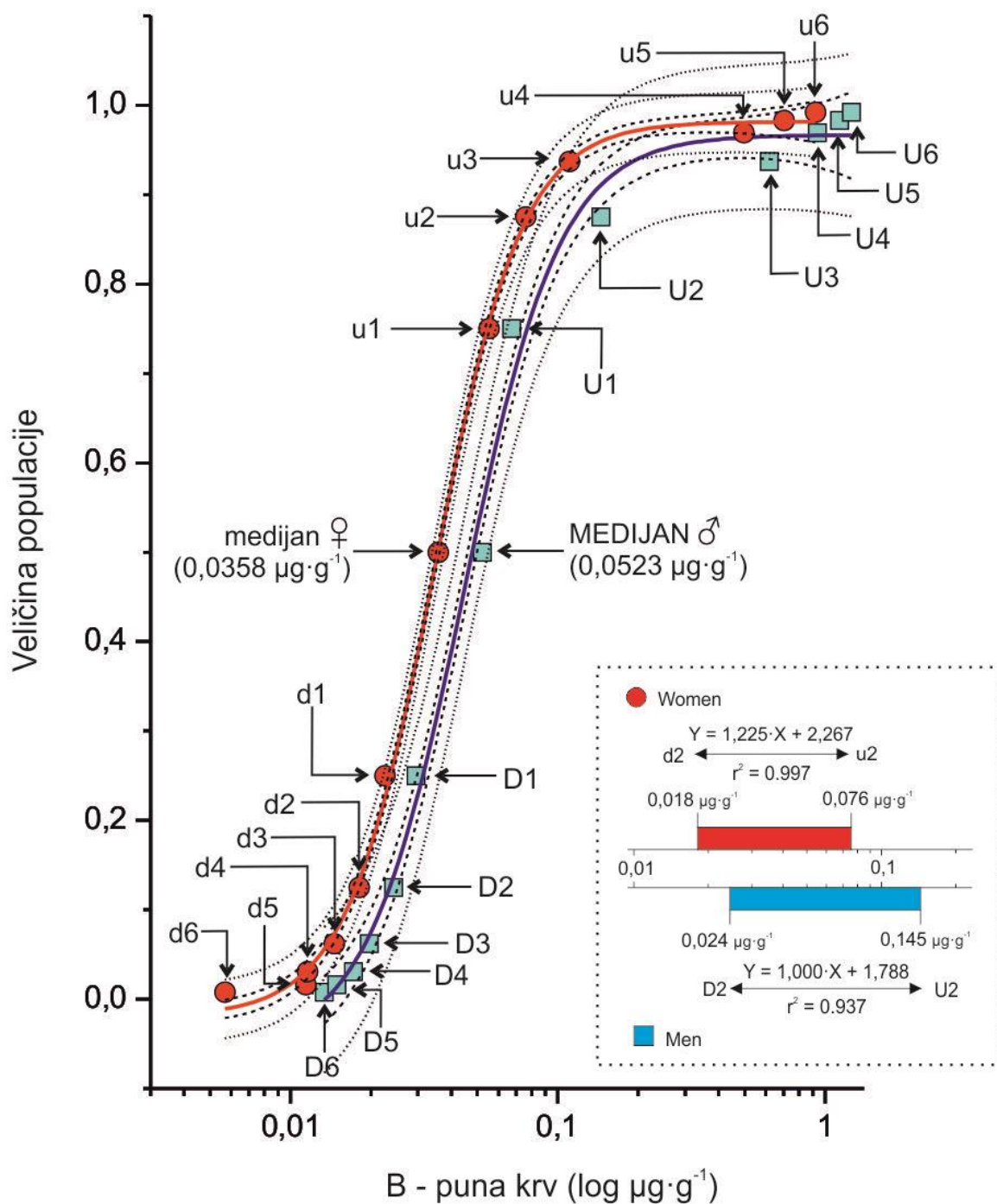


Slika 17a. Normalna raspodjela bora u kosi.



Slika 17b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za B u kosi.





Slika 17c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za B u krvi.

Slika 17a. Histogram koncentracija bora u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). ---  
Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su  
vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa:  
logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika  
(n).

Slika 17b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za B u kosi.

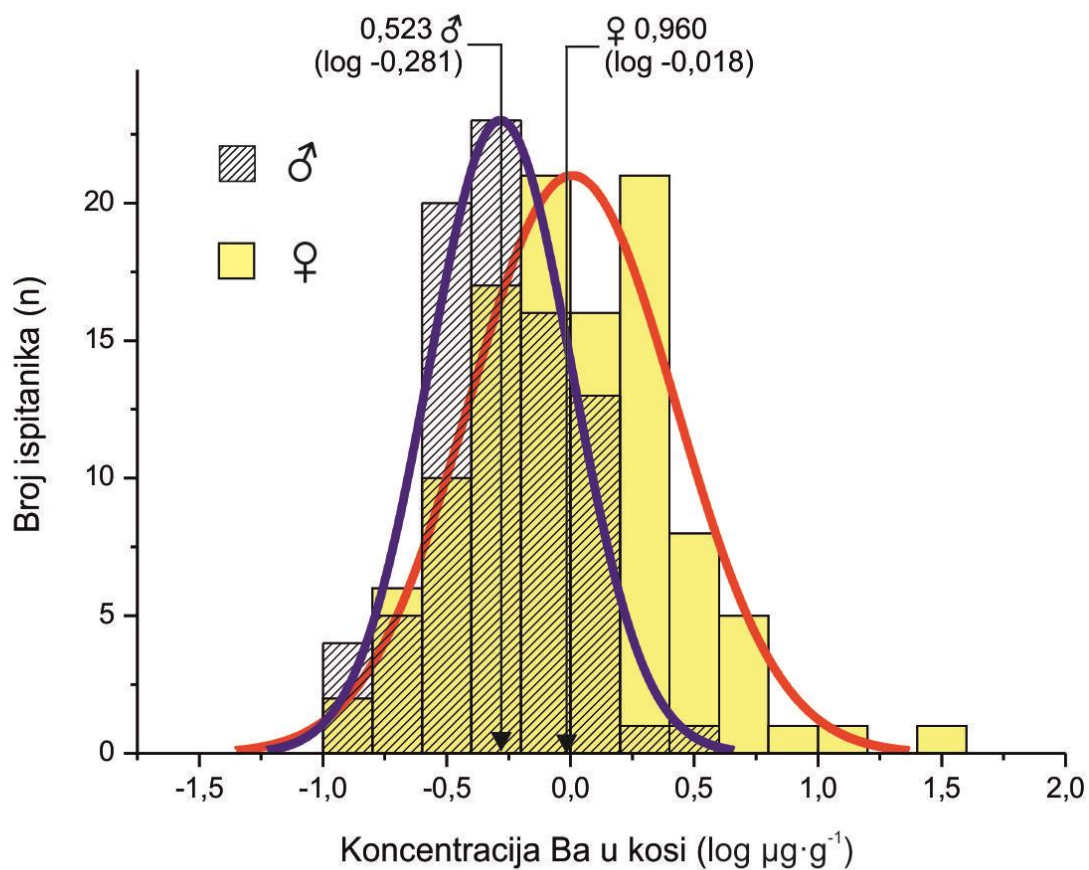
Muškarci:  $Y = 1,090 + (-0,008 + 1,090)/(1 + (X/1,841)^{1,590})$ ,  $r^2 = 0,999$ ;

Žene:  $Y = 0,978 + (-0,017 + 0,978)/(1 + (X/0,872)^{2,264})$ ,  $r^2 = 0,997$ .

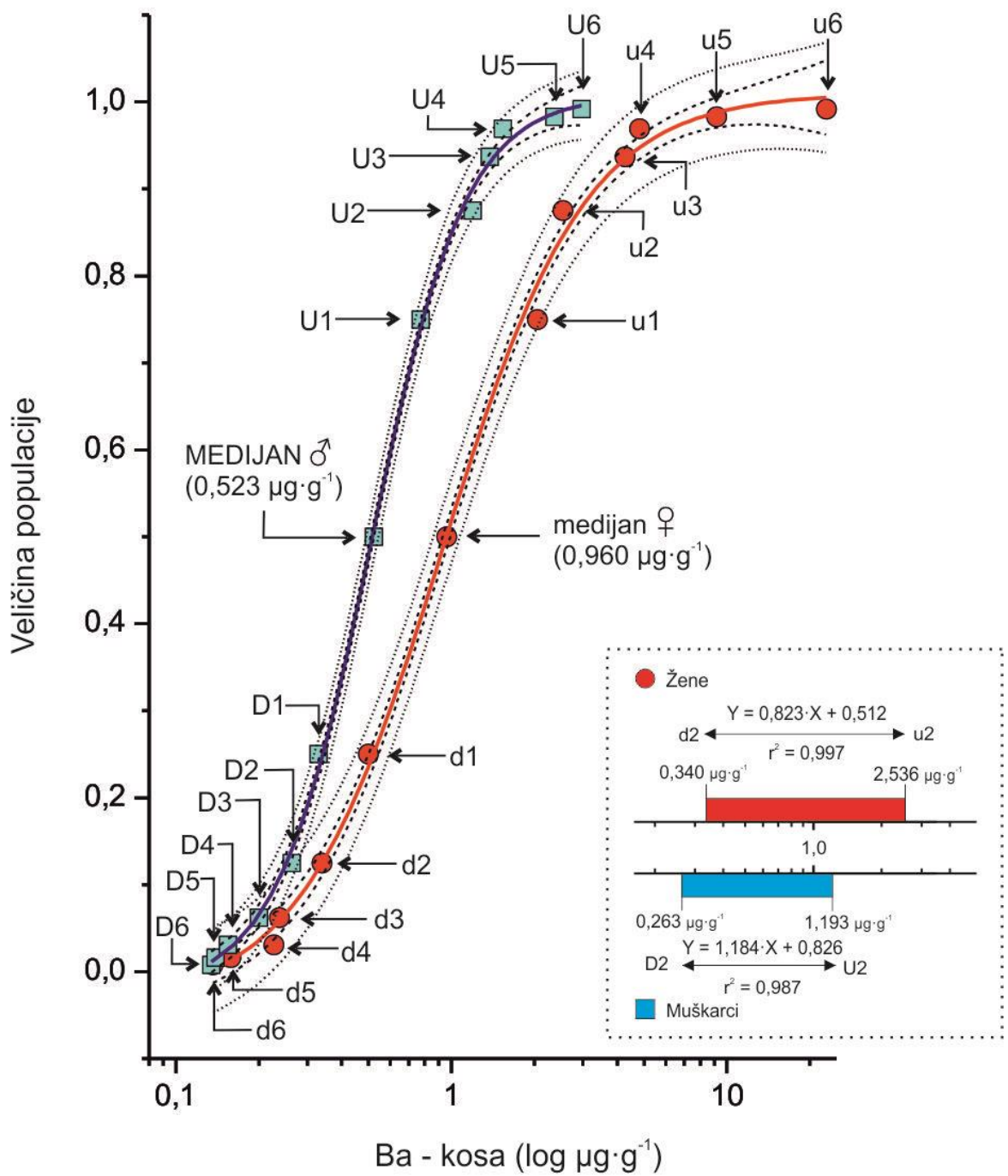
Slika 17c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za B u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,967 + (-0,054 + 0,967)/(1 + (X/0,045)^{2,412})$ ,  $r^2 = 0,994$ ;

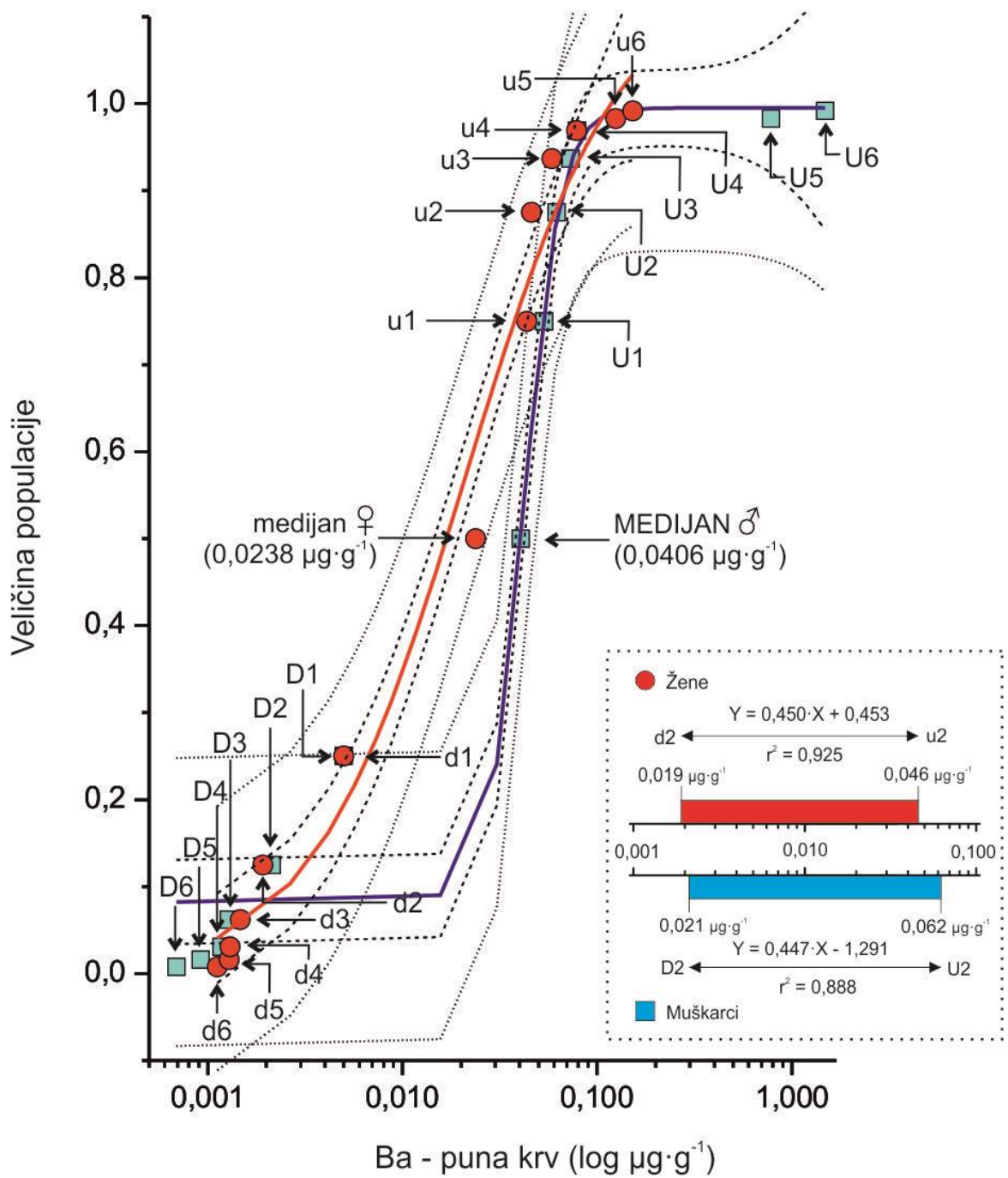
Žene:  $Y = 0,981 + (-0,019 + 0,981)/(1 + (X/0,035)^{2,645})$ ,  $r^2 = 0,999$ .



Slika 18a. Normalna raspodjela barija u kosi.



Slika 18b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ba u kosi.



Slika 18c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ba u krvi.

Slika 18a. Histogram koncentracija barija u kosi (širina stupca =  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). ---  
Krivulja normalne raspodjele za muškarce (plavo) i žene (crveno). Označene su vrijednosti medijana za svaki element za žene i muškarce ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}/\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Apscisa: logaritmirane koncentracije za pojedini element ( $\log \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ordinata: broj ispitanika (n).

Slika 18b. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ba u kosi.

Muškarci:  $Y = 1,008 + (-0,023 + 1,008)/(1 + (X/0,510)^{2,533})$ ,  $r^2 = 0,999$ ;

Žene:  $Y = 1,010 + (-0,038 + 1,010)/(1 + (X/0,929)^{1,677})$ ,  $r^2 = 0,998$ .

Slika 18c. Sigmoidna logistička krivulja derivata medijana za Ba u krvi.

Muškarci:  $Y = 0,995 + (0,082 + 0,995)/(1 + (X/0,042)^{4,795})$ ,  $r^2 = 0,973$ ;

Žene:  $Y = 1,153 + (-0,003 + 1,153)/(1 + (X/0,021)^{1,097})$ ,  $r^2 = 0,978$ .

## 5.6 Komparativna multielementna analiza

Sumarno, iznosimo pregled rezultata komparativne analize multielementnih profila po elementima, odvojeno za kosu i punu krv (Tablica 10a i 10b). U tablici su prikazani medijani za muškarce i za žene, te rasponi koncentracija koji se odnose na segment sigmoidnih krivulja gdje se sustav ponaša linearno (za muškarce  $D_2 - U_2$ , za žene  $d_2 - u_2$ ). Izdvojeni su i rezultati usporedbe koncentracija po spolovima. Kao statistički značajne razlike između muškaraca i žena uzeti su rezultati koji su potvrđeni sa oba korištena testa – Mann-Whitney  $U$  test i  $\chi^2$  test;  $M > \check{Z}$  gdje je koncentracija elementa u uzorkovanom tkivu veća u muškoj populaciji, odnosno  $\check{Z} > M$  gdje je veća u ženskoj populaciji te  $M = \check{Z}$  gdje se nije potvrdila spolna razlika sa oba testa.

Tablica 10a. Komparativna multielementna analiza u kosi.

Element	Medijan ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		Raspon ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		Razlika u koncentracijama	
	Ž (♀)	M (♂)	d2 – u2	D2 – U2		
B	0,860	1,623	0,434 – 2,570	0,578 – 4,766	M > Ž	
Ba	0,960	0,523	0,340 – 2,536	0,263 – 1,193	Ž > M	
Ca	2038,0	592,0	716,2 – 4632,5	345,1 – 1424,1	Ž > M	
KOSA	Mg	56,9	192,0	68,7 – 505,9	35,6 – 149,1	Ž > M
	P	141,0	155,2	115,7 – 197,7	121,0 – 205,4	M > Ž
	Si	34,5	21,9	16,6 – 106,7	10,5 – 47,3	Ž > M
	Sr	3,490	1,156	1,093 – 7,411	0,433 – 3,315	Ž > M
	Zn	184,0	193,8	131,6 – 264,6	127,0 – 256,8	M = Ž



Tablica 10b. Komparativna multielementna analiza u punoj krvi.

Element	Medijan ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		Raspon ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		Razlika u koncentracijama	
	Ž (♀)	M (♂)	d2 – u2	D2 – U2		
B	0,0358	0,0523	0,018 – 0,076	0,024 – 0,145	M = Ž	
Ba	0,0238	0,0406	0,019 – 0,046	0,021 – 0,062	M > Ž	
Ca	62,30	59,93	48,45 – 77,78	50,60 – 77,20	M = Ž	
KRV	Mg	31,51	31,35	27,78 – 37,21	27,72 – 38,78	M = Ž
	P	366,4	386,0	316,0 – 452,0	332,0 – 418,0	M = Ž
	Si	0,980	1,740	0,000 – 2,820	0,383 – 11,967	M = Ž
	Sr	0,0142	0,0137	0,0099 – 0,0199	0,0096 – 0,0213	M = Ž
	Zn	5,70	6,53	4,89 – 6,54	5,50 – 7,60	M > Ž

Kost je dinamično tkivo koje se neprekidno remodelira tijekom cijeloga života. Kostur čovjeka sastoji se od 206 kostiju i igra nekoliko esencijalnih uloga u ljudskom tijelu kao što su potpora, zaštita vitalnih struktura, omogućavanje pokreta te služi kao metabolički rezervoar kalcija, magnezija, fosfora i drugih minerala nužnih za homeostatske funkcije. Sastoji se od organske i anorganske frakcije. Organski matriks daje fleksibilnost i snagu, a sastoji se od osteoblasta, osteoklasta, osteocita, globularnih proteina (osteonektina i osteokalcina), proteoglikana i glikoproteina <sup>113</sup>. Anorganski dio čini 65% ukupne koštane mase i čini ga hidroksiapatit. Kost također sadrže i neke elemente u tragovima koji mogu biti esencijalni i/ili toksični, ovisno o koncentraciji <sup>113</sup>.

Gustoća kosti odnosno sastav razlikuje se između muškaraca i žena. Razlike postoje u gustoći na određenim mjestima u skeletu, i samim time sklonosti frakturama, i kod potpuno istog unosa kalcija. Žene imaju manju gustoću mjerenu na distalnom radijusu, a veću u lumbalnoj kralježnici i vratu femura <sup>230</sup>. Razina svih biljega koštane pregradnje (koštana alkalna fosfataza, prokolagen-I C terminalni propetid, osteokalcin i urinarni N-telopeptid tipa I kolagena) raste s dobi u žena, a najizraženija je poslije menopauze. Porastom dobi smanjuje se gustoća kosti, a navedena promjena izraženija je kod žena. Nadalje, povišeni biljezi koštane pregradnje koji ukazuju na bržu stopu koštanog obrtaja (eng. *turnovera*) povezani su sa smanjenom koštanom masom u oba spola <sup>231</sup>.

U biomedicini se, kao pravilo, koriste neparametrijske metode osim u slučaju da forma distribucije (Gaussova) nije razmjerno sigurno utvrđena ili može biti

postignuta transformiranjem koristeći funkcije nad originalnim setom podataka kao što su npr. logaritamske (*power*), drugog korijena ili eksponencijalne funkcije<sup>232,233</sup>. Ovo je vrlo važan aspekt zbog toga što se arbitrarne pretpostavke donose o normalnosti (u skladu sa Gaussovim modelom) distribucije vrijednosti za dano mjerenje u različitim subjekata, dok bi isto sigurno vrijedilo za višekratna (ponovljena) mjerenja istih podataka u iste individue<sup>234</sup>. Drugim riječima, u većini slučajeva se za distribuciju vrijednosti u zdravih ispitanika ne može pretpostaviti da je normalna. Različite statističke metode osmišljene su da bi se odredio tip distribucije. U članku objavljenom 2011.g. u *The Journal of Staistical Modeling and Analytics*<sup>235</sup> zaključeno je da Shapiro-Wilkov test ima najveću snagu za određenu značajnost nakon čega slijede Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov i Lilliefors test. Nadalje, izgled histograma koristan je za procjenu *outliera* i aberantnih vrijednosti, modova, te nekih osobina krivulje kao što su *skewness* i *kurtosis* (statističke mjere asimetrije i „ušiljenosti“ krivulje).

U ovom istraživanju, za procjenu normalnosti distribucije korišteni su Shapiro-Wilkov test te kao potvrda nalaza Kolmogorov-Smirnov test<sup>235</sup>. Kako se radi o distribucijama koncentracija (u kosi i punoj krvi) koje ne prate normalnu krivulju, za usporedbu skupina po spolu korišten je Mann-Whitney *U* test kao neparametrijska alternativa t-testu.

Potrebno je detaljnije osvrnuti se na razliku u metabolizmu ispitanih elemenata između muškaraca i žena. Analizirano je osam elemenata koji pokazuju afinitet za odlaganje u kost; abecednim redom: bor, barij, kalcij, magnezij, fosfor, silicij, stroncij i cink. Od njih neki imaju jasno definiranu ulogu u koštanom metabolizmu (Ca, Mg, P, Zn), neki ne potpuno jasnu fiziološku funkciju (Si, Sr, B), dok za Ba nemamo

podataka je li u fiziološkim koncentracijama, kakve nalazimo u kostima toksičan. Vrijednosti makroelemenata (Ca, Mg, P) i nekih elemenata u tragovima (Zn) u biološkim uzorcima, prvenstveno serumu, često su određivane i njihove vrijednosti imaju poznate referentne raspone većim dijelom zbog potrebe kliničke prakse<sup>112</sup>, dok dozvoljeni rasponi vrijednosti za većinu ostalih elemenata u tragovima (B, Ba, Si, Sr) nisu određeni. Također niti za jedan od navedenih elemenata nije poznato postoji li metabolička razlika između muškaraca i žena koja bi rezultirala različitim vrijednostima u biološkim uzorcima pune krvi i kose. Tek najnoviji pojedinačni izvještaji na većim uzorcima za neke češće analizirane elemente (Ca, Mg, Zn) navode razlike koncentracija ovisnih o spolu<sup>29,30</sup>.

Svih 8 elemenata određeno je simultano u sva 192 uzorka kose (109 žena i 83 muškarca), a  $U$  testom dobivene su statistički značajne razlike u kosi za 7 od 8 elemenata i ti su nalazi potvrđeni  $\chi^2$  testom uspoređujući broj muškaraca odnosno žena ispod i iznad zajedničkog medijana. Žene imaju statistički značajno više koncentracije u kosi, uvjetno rečeno, većine glavnih elemenata koji čine kost. U prvom redu to je kalcij ( $p_U$  vrijednost Mann-Whitney  $U$  testa [ $p_U$ ] < 0,001, medijan za muškarce [ $M_{\delta}$ ] = 592,0, medijan za žene [ $M_{\square}$ ] = 2038,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), nakon čega slijede magnezij ( $p_U$  < 0,001,  $M_{\delta}$  = 56,9,  $M_{\square}$  = 192,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), silicij ( $p_U$  < 0,001,  $M_{\delta}$  = 21,87,  $M_{\square}$  = 34,49  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), stroncij ( $p_U$  < 0,001,  $M_{\delta}$  = 1,156,  $M_{\square}$  = 3,490  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), te neesencijalni barij ( $p_U$  < 0,001,  $M_{\delta}$  = 0,523,  $M_{\square}$  = 0,960  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Kod muškaraca su u kosi ovom vrstom statističke analize značajno više vrijednosti fosfora ( $p_U$  = 0,012,  $M_{\delta}$  = 155,2,  $M_{\square}$  = 141,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) kao esencijalnog elementa i uz Ca i Mg najznačajnijeg u koštanom metabolizmu i neesencijalnog bora ( $p_U$  < 0,001,  $M_{\delta}$  = 1,623,  $M_{\square}$  = 0,860

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Jedini element za koji se nije našla razlika ovisna o spolu u kosi je cink ( $p_U = 0,729$ ,  $M_{\text{♂}} = 193,8$ ,  $M_{\text{♀}} = 184,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Detalji u Apendiksu 1, i Tablicama 1 i 10.

Od ukupno 192 ispitanika, krv je analizirana u 158 slučajeva od kojih su 88 žene i 70 muškaraca. Preostala 34 uzorka (21 žena i 13 muškaraca) izgubljena su prije postupka analize. U slučaju samo 4 ispitanika (2 žene i 2 muškarca) koncentracije Ca i P ista 4 ispitanika imalo je koncentracije ispod razine granice detekcije koja za Ca iznosi  $0,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a za P  $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . U slučaju silicija 20 je ispitanika, od čega 14 žena i 6 muškaraca, imalo koncentracije ispod razine granice detekcije koja je u tom slučaju iznosila kao i za Ca -  $0,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . U svim ostalim uzorcima odredili smo koncentracije B, Ba, Mg, Sr i Zn. Treba imati na umu da je za ovakva istraživanja pouzdanije gledati ukupne vrijednosti elemenata u punoj krvi nego pojednoj komponenti jer određivanje elementa u plazmi može dati lažno visoke vrijednosti zbog hemolize zbog čega je onda potrebno uzeti u obzir i vrijednosti željeza <sup>236</sup>.

Definitivna razlika ovisna o spolu u uzorcima pune krvi, koristeći oba testa ( $U$  test i  $\chi^2$  test), potvrđena je samo za dva elementa gdje u oba slučaja muškarci imaju značajno više koncentracije u odnosu na žene – barij ( $p_U = 0,025$ ,  $M_{\text{♂}} = 0,0406$ ,  $M_{\text{♀}} = 0,0238 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i cink ( $p_U < 0,001$ ,  $M_{\text{♂}} = 6,530$ ,  $M_{\text{♀}} = 5,700 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Koristeći se Mann-Whitneyjevim  $U$  testom značajna razlika nađena je u korist muškaraca za bor ( $p_U = 0,020$ ,  $M_{\text{♂}} = 0,0523$ ,  $M_{\text{♀}} = 0,0358 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i silicij ( $p_U = 0,006$ ,  $M_{\text{♂}} = 1,740$ ,  $M_{\text{♀}} = 0,980 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) koja nije potvrđena  $\chi^2$  testom (B:  $p$  vrijednost  $\chi^2$ -testa [ $p_{\chi^2}$ ] = 0,372; Si:  $p_{\chi^2}$  = 0,211). Stoga možemo govoriti o tendenciji da muškarci imaju povišene vrijednosti ova dva elementa u krvi što je vidljivo i na grafičkom prikazu derivata medijana (Slika 12c i 18c). Tendencijom smatram različit interpretativni statistički nalaz između Mann-Whitney  $U$  testa i  $\chi^2$  testa. Zanimljivo je da ni u slučaju jednog elementa žene nemaju

povišene vrijednosti u punoj krvi što bi se moglo potvrditi koristeći oba testa.

Povišene vrijednosti u ženskoj populaciji u krvi pokazuje kalcij temeljem  $\chi^2$  testa ( $p_{\chi^2} < 0,001$ ) dok  $U$  testom tu razliku nisko dokazali ( $p_U = 0,405$ ,  $M_{\text{♂}} = 59,93$ ,  $M_{\text{♀}} = 62,30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Isto vrijedi i za fosfor ( $p_{\chi^2} = 0,050$ ,  $p_U = 0,396$ ,  $M_{\text{♂}} = 386,0$ ,  $M_{\text{♀}} = 366,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Dva elementa koja definitivno ne pokazuju razlike ovisne o spolu su, pak, dva koja u kosi najbolje koreliraju sa kalcijem. Riječ je o magneziju ( $p_U = 0,493$ ,  $M_{\text{♂}} = 31,35$ ,  $M_{\text{♀}} = 31,51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i stronciju ( $p_U = 0,754$ ,  $M_{\text{♂}} = 59,93$ ,  $M_{\text{♀}} = 62,30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Što se tiče koherentnosti dobivenih vrijednosti, naše dobivene koncentracije usporedive su sa onim rasponima dobivenim od strane drugih autora o čemu će biti detaljnije kasnije. Za detalje vidjeti Apendiks 1 i 2.

Nalazi značajno povišenih vrijednosti Ca, Mg, Si, Sr i Ba u kosi žena (u odnosu na muškarce) govore u prilog tomu da kosa ima potencijal indikatorskog tkiva koštanog metabolizma, odnosno, koštanog obrtaja u zdravoj populaciji. Pogotovo se to odnosi na Ca koji čini najveći dio vlasi (63% od zbroja koncentracija testiranih elemenata), slično kao i u kosti gdje je najzastupljeniji element; peti je po zastupljenosti u cijelom organizmu nakon kisika, ugljika, vodika i dušika čineći 1,4% ukupne mase tijela<sup>233</sup>. I ranije se analiza elemenata u tragovima koristila za procjenu koštanog obrtaja u patološkim stanjima kao što je u slučaju pacijenata na hemodijalizi. Potvrđene su povišene vrijednosti Ca i Mg, a uz njih i željeza (Fe), aluminija (Al) i kroma (Cr) u kosi, ali i u krvi bez značajnije korelacije između uzorkovanih tkiva<sup>31</sup>. Definitivno postoji potreba za dugoročnim (engl. *long-term*) biomarkerom intermedijarnog metabolizma elemenata s obzirom da je i sama trabekularna kost vrlo heterogeno tkivo u cijelom skeletu. Značajne razlike između muškaraca i žena vidljive su na nekim, ali ne i na svim mjestima u tijelu<sup>238</sup>.

Visoke vrijednosti Ca u kosi korištene su kao indikator poremećaja u metabolizmu Ca i kosti <sup>23</sup>. Uz to, predloženo je da su razine Ca i Mg u kosi premenopauzalnih žena pouzdaniji pokazatelj koštane mineralne gustoće kralježnice od njihovih vrijednosti u serumu <sup>32</sup>. Prema Songu <sup>32</sup>, poremećaji u biodostupnosti kalcija, demineralizaciji kosti i okoštavanju mekih tkiva te hormonalni poremećaji moguća su objašnjenja ovih abnormalnosti. Danas se smatra da zbog kontinuiranog mehanizma izmjene kalcija koji je sadržan u kosti i onog kalcija koji se nalazi u krvi, dokle god postoji adekvatna količina kalcija u krvi, i njegova količina u kosti ostaje konstantna. No, ako razina u krvi počne padati, tijelo resorbira više Ca iz kosti nego li se može u nju vratiti što rezultira gubitkom mineralne koštane mase. Adekvatna razina Ca u krvi vitalna je za mnoge tjelesne funkcije tako da naš metabolizam ne tolerira nedostatak ni na kraći vremenski period za što se misli da može uzrokovati značajno slabljenje kostiju.

Biodostupnost, metabolizam i status kalcija u organizmu pod utjecajem je ne samo ukupnog unosa Ca već i vitamina D i ostalih čimbenika kao što su prisustvo promotora odnosno inhibitora apsorpcije u konzumiranoj hrani, dodatnih čimbenika specifičnih za organizam kao što su zdravlje, hormonski status, fizička aktivnost i lijekovi koji mogu utjecati na apsorpciju Ca <sup>239</sup>. Primjerice, glavna posljedica nedostatka vitamina D je poremećaj intestinalne apsorpcije Ca koju prati serija adaptacijskih/kompenzacijskih odgovora. U prvom redu, snižena razina serumskog Ca<sup>2+</sup> stimulira izlučivanje paratireoidnog hormona (PTH) koji dalje potiče produkciju aktivnog metabolita vitamina D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D) posljedično povećavajući intestinalnu apsorpciju Ca. Kao dodatak toj parcijalnoj adaptaciji, PTH potiče i bubrežnu reapsorpciju Ca (pozitivna kompenzacija), ali ubrzava resorpciju kosti (negativna

kompenzacijska akcija)<sup>113</sup>. Uslijed fizioloških kompenzacijskih mehanizama, razina Ca u organima, tkivima i kosi posljedica je više varijabli.

U literaturi do sada ne postoji mnogo podataka o spolnim razlikama ovih osam elemenata u uzorcima kose i pune krvi. Opisana je razlika u slučaju Ca, Mg i Zn u poljskoj populaciji<sup>29,30</sup> gdje žene imaju više Ca i Mg u kosi bez objašnjenja po pitanju etiologije. Također, u kosi postoji povećanje omjera Ca/P i Ca/Mg ovisno o dobi uz signifikantno veći prvo navedeni omjer u ženskoj populaciji<sup>33</sup>. Poznato je da estrogen ima snažan učinak na minerale i funkcije u čijim regulacijama sudjeluju. Prvenstveno se to odnosi na kalcij, kalij i bakar, a u manjoj mjeri i na magnezij, natrij, cink i fosfor<sup>236</sup>. Naši rezultati potvrđuju hipotezu da se vrijednosti osteotropnih elemenata u kosi kao dugoročnom metaboličkom indikatoru razlikuju. Kako su metabolizam Ca i Mg najviše vezani uz funkciju estrogena, za očekivati je da će ovi elementi pokazivati i najznačajnije razlike u koncentracijama.

Manjak estrogena u menopauzi potiče gubitak spongiozne i kortikalne kosti. Značajno povišena resorpcija sponginozne kosti dovodi do općeg gubitka koštane mase i razaranja koštane arhitekture zbog resorpcije i mikrofraktura. Ovaj učinak posredovan je putem nekih citokina, najvjerojatnije IL-1 i IL-6<sup>241</sup>.

Jedno od važnijih pitanja u ovoj disertaciji je i pitanje korelacije pojedinih varijabli, odnosno jesu li validirani rezultati u kosi sa nekim drugim tkivom koje se češće koristi kao bioindikator, npr. puna krv, plazma, serum ili urin. Takva pitanje bila bi od interesa odlučimo li uspoređivati određeni kratkoročni biomarker sa nekim drugim kratkoročnim odnosno dugoročni sa nekim drugim dugoročnim biomarkerom. Rezultati izneseni u Tablici 9 pokazuju da ne postoji međusobno zavisni odnos



između kratkoročnog i dugoročnog biomarkera pune krvi i kose u procjeni statusa organizma po pitanju niti jednog od elemenata koji su predmet ove disertacije. Niti jedan od naših testiranih elemenata ne pokazuje statistički značajnu korelaciju između kose i pune krvi. Slično smo dokazali i u slučaju joda <sup>242</sup>.

Povišene vrijednosti Ca i Mg u kosi povezane su sa smanjenim ukupnim statusom tih elemenata u organizmu. Također, vrlo visoke vrijednosti Ca ( $>1900 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) u žena sa primarnim hiperparatireoidizmom ili hipertireoidizmom upućuju na to da kosa djeluje kao manji ekskrecijski organ odražavajući mobilizaciju Ca iz kosti u oba patološka stanja <sup>32</sup>. Nadalje, visoki unos vitamina D pozitivno je koreliran sa odlaganjem Ca u kosu <sup>243</sup>.

Pozitivna korelacija Ca i Mg u kosi ( $p<0,001$ ) u skladu je sa ranijim istraživanjima <sup>29,30,243,244</sup>. Viši unos Mg može rezultirati višim sadržajem Ca u kosi. To se objašnjava sinergističkim djelovanjem ovih elemenata u tijelu, a enzim involviran u proces aktivacije bubrežne hidroksilacije vitamina D vjerojatno je ovisan o magneziju <sup>243</sup>.

Istraživanje elemenata u kosi pokazalo je da Ca, Mg i Sr imaju sinkrono povišene, odnosno snižene koncentracije. Dakle, nije neočekivano da Mg i Sr pokazuju iste spolne razlika kao i Ca. Za razliku od Ca i Sr, Mg je više vezan uz odgovora na stres i njegove učinke. Poznato je protektivno djelovanje magnezija na induciranu mineralizaciju mekih tkiva (kalcifilaksa) <sup>245</sup>. Kao i Ca, magnezij je poglavito unutarstanični mineral, usporava aktivnost nadbubrežnih žlijezda i to ga čini vitalnim protustresnim mineralom <sup>33</sup>. Uz navedene u kosi u istu skupinu spadaju i neesencijalni Ba te Zn. Za razliku od ostalih osteotropnih elemenata, Zn je jedini koji u kosi ne pokazuje statistički značajnu razliku ovisnu o spolu.

I u krvi kao kratkoročnom pokazatelju, korelacija Ca i P kao dva međuzavisna osteotropna elementa očekivana je. Visoke vrijednosti kalcija i fosfora te snižene magnezija u serumu povezane su sa rizikom ubrzanog razvoja ateroskleroze i nagle srčane smrti <sup>246</sup>. Slijede one između Ba i Sr, te dobi sa B, Mg i Si. Moguća metabolička ovisnost biti će opisana kasnije u tekstu. Svi ovi rezultati upućuju na to da se za procjenu nutritivnog statusa određenog elementa isti ne može proučavati zasebno već u okviru cjelokupne biološke matrice ili barem uz prateće „ključne“ elemente.

Jedna od razlika, koja se može činiti među elementima, je ona temeljena na tome jesu li oni esencijalni za ljudsko zdravlje ili nisu. S ovog gledišta dobro je poznato kakvu neposrednu ulogu igraju neki elementi u ljudskom organizmu u manjim ili većim koncentracijama. S druge strane pak, neke vitalne biokemijske funkcije mogu biti potaknute minimalnim količinama nekih elemenata u tragovima. A često se stajalište po pitanju esencijalnosti mijenja ovisno o novim dokazima. Primjer za to je Zn koji je godinama smatran toksičnim, potom neutralnim, da bi danas imao nezamjenjivo mjesto u brojnim enzimima (više od 100 različitih), a sastavni je dio svih šest skupina enzima <sup>247</sup>.

S ovom složenom višedimenzionalnom slikom na umu, prilično je očito da postoje dvije bazično različite potrebe za prisustvom elemenata u tijelu., tj. esencijalni elementi moraju postojati u zadanom intervalu koncentracija optimalnom za fiziološko odvijanje vitalnih procesa, dok potencijalno toksični elementi trebaju postojati u najmanjoj mogućoj mjeri. U prvom slučaju, količine i dozvoljene oscilacije regulirane su homeostatski kontroliranim mehanizmima koji obnavljaju idealnu ravnotežu kada god je ona narušena. To je moguće oslobađajući tvari iz tjelesnih rezervi kada nije

moguće povećati apsorpciju u slučaju deficita ili izlučivanjem viška kada isti nastane. Očito, prehrambene navike, životni stil, karakteristike podneblja i spol utječu na ove intervale; dakle, oni mogu varirati do određene granice od jedne populacije do druge<sup>248</sup>.

Ovakve granice iznimno su korisne da se definiraju normalne vrijednosti za jasno određene populacije. Devijacije izvan takvih okvira mogu ukazivati na moguće patološko stanje te uputiti na daljnju obradu, a sasvim suprotno, za neesencijalne elemente, pravila bi bila drugačija. Iako bi njihova koncentracija u biološkim tkivima trebala biti nula, pragmatičniji je pristup sa tolerabilnim vrijednostima, odnosno pragom (engl. *threshold*) vrijednosti ispod kojega bi njihove štetne posljedice po organizam bile zanemarive. Ova strategija izrade referentnih vrijednosti bolja je kada se izvodi iz zdravih pojedinaca i osobito učinkovita u evaluaciji podjela i isključnih kriterija za podgrupe opće populacije. U procesu dijeljenja rabe se kategorije kao što su dob i spol od kojih svaka traži specifičan pristup. Određivanjem referentnih vrijednosti dolazimo do određivanja referentnih intervala odnosno granica pouzdanosti i predikcije<sup>215</sup>.

## 6.1 Kosa i krv kao biomarkeri

Kosa je u suštini organski filamentozni polimer. Folikul dlake stvara protein keratin koji snažno kelira minerale, a stvara zaštitni sloj koji sprječava gubitak nakupljenih elemenata a time daje veću kemijsku stabilnost nekim elementima (Ca, Mg, Zn) nego, npr. onima testiranima iz krvi<sup>249</sup>. Kao i kosti te drugi organi, kosa služi kao tkivo za odlaganje esencijalnih minerala kako i onih toksičnih za ljudsko zdravlje (npr. olovo) koji nestaju iz krvi u roku od nekoliko sati. Iz tog razloga kosa je odličan

biološki materijal za biopsiju. Maugh<sup>37</sup> je u *Science* predložio da analiza minerala u kosi ima potencijal da upotpuni urin i krv kao dijagnostičko sredstvo. Istaknuo je da se lako prikuplja, pohranjuje i analizira. Koncentracija elemenata je 10-50 puta viša u usporedbi s krvi (osim željeza, mangana i fosfora), a lakše se analizira no krv zbog prisustva kompleksnih proteina, porfirina, šećera i brojnih drugih spojeva u krvi<sup>249</sup>.

Danas se kosa smatra neinvazivno prikupljenim, reproducibilnim i lako dostupnim biomarkerom za pouzdano određivanje multielementnog statusa ljudskog organizma u općoj populaciji<sup>248,250-253</sup>.

Ipak, nekoliko riječi potrebno je da bi se razjasnila pozadina oko moguće uloge koju puna krv i kosa mogu imati kao kratkoročni odnosno dugoročni biomarker statusa elemenata. Puna krv, serum i plazma najčešće su korišteni biomarkeri u praćenju ljudskog zdravlja, ali oni se mogu koristiti samo kao kratkoročni pokazatelj statusa bioelemenata u organizmu<sup>250</sup>. Bioelementi koji su najzastupljeniji u punoj krvi najčešće se nalaze vezani za neke druge, homeostatski kontrolirane konstituente koji su u dinamičkoj interakciji i koji se izmjenjuju sa tkivima i tjelesnim tekućinama koje ih okružuju. S druge strane, kosa je atraktivno biomarkersko tkivo, polimeriziran vlaknasti protein (keratin)<sup>254-256</sup> koji se prikuplja na neinvazivan način, lako pohranjuje i transportira do analize te najčešće ima koncentracije bioelemenata iznad razine detekcije potrebne za preciznu kemijsku analizu. Nadalje, glavna prednost kose za određivanje dugoročnog nutritivnog statusa elemenata i toksičnog statusa (tjelesnog opterećenja) je njen jednosmjerni rast. Jednom kad se određeni bioelement ugradi u vlas, dalje ne podliježe izmjenama (uravnotežavanju) između tkiva te na taj način služi kao trajni vremenski zapis o nutritivnom statusu odnosno izloženosti. Kad se element apsorbira u organizam, široko se distribuira po organima

i tkivima prije nego li dosegne folikul dlake i trajno se ugradi u vlakna kose. Rastom kose od oko 1 cm mjesečno sve homeostatski kontrolirane promjene u koncentracijama bioelemenata nepovratno se zapisuju u kosu<sup>254,256</sup>. Vremenski 1 cm kose odgovara približno 30 dana kumulativnog sakupljanja urina<sup>257,258</sup>.

Od početaka istraživanja elemenata u tragovima, analitičke tehnike postale su sve naprednije i profinjenije, kemikalije čišće, referentni standardi dostupniji, unaprijedile su se tehnike razlaganja uzoraka... da se navedu samo neki od najznačajnijih čimbenika. Unatoč svim ovim unaprjeđenjima, rasap elemenata u kosi i krvi i njenim sastavnicama ostaje jednako izražen kao i do sada<sup>259</sup>. Očito je da ovaj rasap nije uzrokovan nedostacima kemijsko-analitičkog procesa, a postojanje tog rasapa sprječava širu primjenu analize elemenata u tragovima u kliničkoj praksi i za dobrobit pacijenata. Ovdje prezentirani rezultati osteotropnih elemenata u ova dva biološka tkiva pokazuju da je rasap analitičkih podataka rezultat neprimjerene organizacije podataka prije statističke analize. Doista, odlaganje srebra (Ag), aluminijska (Al), kalcija (Ca), magnezija (Mg), fosfora (P), kalija (K), selena (Se), natrija (Na) i cinka (Zn)<sup>255-258</sup> u kosi nije linearno u odnosu na koncentraciju elementa, nego podliježe zakonu potencije (engl. *power law*)<sup>263</sup>. Svi elementi u biomatricama, a izraženije u uzorcima kose, pokazuju isti obrazac iskrivljenosti (engl. *skewenes*) i spljoštenosti (engl. *kurtosis*) distribucije skupa podataka kada se prikažu na linearan način bez logaritamske transformacije koja bi stvorila uvjete za pojavu krivulje Gaussove distribucije. Međutim, derivati medijana tvore funkciju potencije sigmoidne krivulje analognu često korištenoj krivulji saturacije hemoglobina kisikom<sup>264</sup>. U većini navedene literaure, skupovi podataka ograničeni su ukupnim brojem istraživanih elemenata i brojem analiziranih uzoraka. Treba ovdje naglasiti da su veliki multielementni skupovi podataka postali dostupni tek nedavno. Štoviše, tek nakon

šire primjene ICP MS u posljednjem desetljeću dvadesetog stoljeća, veliki skupovi podataka bioelemenata postaju dostupni za kompleksniju statističku i grafičku analizu, dalje od uobičajene linearne regresije i percentila.

## 6.2 Logističke krivulje derivata medijana

Dobivena sigmoidna krivulja derivata medijana omogućuje nam procjenu trenutne razine nutritivnog statusa bioelemenata odnosno saturacije organizma razmjerno pouzdano. Veći skupovi podataka su potrebni za utvrđivanje pouzdanijih referentnih standarda za korištenje u personalizirnoj medicini, zdravstvenoj praksi i u epidemiološkim istraživanjima prehrane. Do sada se nije moglo vjerodostojno tvrditi koja je granična koncentracija koja predstavlja manjak, odnosno iznad koje koncentracije govorimo o pretjeranom unosu određenog elementa te koja je granična vrijednost za pojačani metabolizam (obrtaj) elemenata u kostima. Temeljem ovih rezultata možemo reći da više vrijednosti kalcija, magnezija, stroncija, silicija u kosi žena označavaju pojačani koštani metabolizam s obzirom da se radi o esencijalnim elementima za izgradnju kosti. Što je viša vrijednost tih elemenata – veća je vjerojatnost povećanog metaboličkog obrtaja (engl. *turnover*) odnosno rizika od osteomalacije i/ili osteopenije. Paradoksalno, taj metabolički obrtaj uzrokovan je nutritivnim manjkom elemenata koji utječu na mineralizaciju ili na stvaranje biološkog matriksa. Suprotno očekivanom, pokazano je da suplementacija Ca, Mg, Si i vitaminom D dovodi do smanjenja koncentracije navedenih elemenata u kosi kod žena sa inicijalno visokim vrijednostima istih<sup>43</sup>. Ova pojava nazvana je „kalcijevim paradoksom kose“, a smatramo da ukazuje na redistribuciju dostupnog Ca, Mg i Si tako da se mogu koristiti u izgradnji koštanog matriksa, a ne njihovu eliminaciju

putem kose. To znači da je za odlaganje nekog elementa u kosu neophodno da postoji i neki povoljni razmjer među njima.

Ovakva sigmoidna krivulja funkcije potencije (*power function*) derivata medijana dozvoljava nam procjenu prirodne sposobnosti (kapaciteta) kose za odlaganje elemenata te krvi kao odraz kompenzacijskih homeostatskih mehanizama. Ovaj kapacitet na nelinearan način ovisi o koncentraciji pojedinog elementa s obzirom na to da je samo određeni dio krivulje linearan. S obzirom na spolne razlike prisutne prvenstveno u kosi, ovakav prikaz omogućava nam po prvi puta razlikovanje obrasca odlaganja pojedinih elemenata u kosu između muškaraca i žena. Obrazac odlaganja za Ba, Ca, Mg, Si i Sr sličan je već viđenom obrascu odlaganja joda u kosu <sup>265</sup> gdje ga muškarci odlažu u kosu ranije nego žene. Nasuprot tome, žene ranije počinju odlagati B i P u kosu, a kasnije muškarci postižu više vrijednosti. Drugim riječima, saturacijski kapacitet za te elemente veći je u muškaraca nego u žena.

U krvi iznad točke U<sub>2</sub>, odnosno u<sub>2</sub> završava linearni segment i nastavlja se eksponencijalno uzlazni dio krivulje. U tom segmentu nalazi se gornjih 12,5% vrijednosti (12,5% ispitanika sa najvišim vrijednostima) i označava koncentracije koje koje su odraz hipersaturacije organizma u smislu da homeostatski mehanizmi nisu u mogućnosti kompenzirati višak pojedinog elementa neovisno o izvoru. Odnosno, da je iscrpljen fiziološki mehanizam prilagodbe na promjene u koncentraciji bioelemenata.

## 6.3 Elementi

### 6.3.1 Kalcij (Ca)

Linearni segmenti sigmoidnih krivulja distribucije frekvencija opisanih funkcijom potencije nalaze se u pravilu između derivata označenih  $d_2$  i  $u_2$  za žene odnosno  $D_2$  i  $U_2$  za muškarce i izgledom su karakteristični za fiziološki mehanizam saturacije. Tako su granice za normalne vrijednosti u kosi za Ca nalaze u rasponu  $716,2 - 4632,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (medijan u kosi,  $H.M_{\text{♀}} = 2038,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za žene te  $345,1 - 1424,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $H.M_{\text{♂}} = 592,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za muškarce. Vrijednosti ispod donje odnosno iznad gornje granice normalnog raspona ne opisuju pravce već se mogu opisati samo eksponencijalnim funkcijama i odnose se na osobe koje odlažu manje odnosno više kalcija u kosu. Uzevši u obzir kalcijev paradoks, koncentracije iznad vrijednosti od  $4632,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za žene i  $1424,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za muškarce označavaju pojačano odlaganje Ca u kosu i ukazuju na deficit odnosno patološki ili pojačan koštani metabolizam. S druge strane vrijednosti ispod donje granice od  $716,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za žene i  $345,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za muškarce upućuju na značajnije manji unos kalcija i govore za globalni metabolički deficit kada kompenzacijski mehanizmi u krvi ne mogu zadržavati njihove adekvatne vrijednosti iz bilo kojeg drugog izvora. Naše dobivene vrijednosti usporedive su sa vrijednostima u literaturi; srednja vrijednost i standardna devijacija,  $491 \pm 369 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>266</sup>, te rasponi  $170 - 4690 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>248,267</sup> i  $113-2890 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (medijan  $590 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) <sup>268</sup>. Na većem uzorku poljske populacije dobivena je razlika vrijednosti Ca u kosi koja odgovara našim rezultatima uz podjelu prema dobnim skupinama. Ženama u dobi 20 do 40 godina, medijan je  $493 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  uz raspon  $80 - 3250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dok je muškarcima u istoj dobnj skupini medijan  $338 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ( $52 - 2600$



$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>29</sup>. Osobe koje su pripadale starijoj dobnoj skupini (40-60 godina) imale su blago niže izmjerene vrijednosti Ca u kosi - žene  $398,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (29 –  $3350 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) muškarci  $267,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (49 –  $1680 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>30</sup>. Medijani naše ženske i muške populacije viših su vrijednosti uz izraženiju razliku među spolovima uz isti red veličine i tendenciju da žene imaju više vrijednosti Ca u kosi u zdravoj populaciji. Razlike se mogu objasniti veličinom uzorka i eventualnim različitim prehrambenim navikama i samim time nutritivnim statusom organizma. Statistički, sukladno rezultatima faktorske analize, u našoj populaciji žena postoji negativna korelacija kalcija u kosi sa dobi ispitanika koja tom metodom za muškarce nije vidljiva. Detalji u Tablici 3. Negativna korelacija kalcija sa dobi ispitanika dobivena je rezultatom bivarijatne analize (Tablice 3 i 4). Time se može govoriti o potvrdi rezultata prethodno navedenih autora.

Za razliku od kose, vrijednosti u krvi ne razlikuju se ovisno o spolu, štoviše nalaze se unutar vrlo uskog raspona koncentracija. Grafički se prikazuje izraženija tendencija muškaraca (4 od 70) prema nižim vrijednostima Ca u krvi naspram žena, no broj ispitanika u ovom segmentu je nedovoljan da se izvode jasniji zaključci. Segment koji prikazuje linearan trend po ranije definiranom modelu nalazi se za žene od vrijednosti d2 do u2 što u vrijednostima znači od  $48,5$  do  $77,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sa medijanom u punoj krvi ( $\text{WB.M}_{\text{♀}}$ ) od  $62,30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Gotovo identičan segment određen je i za muškarce tako da se raspon D2-U2 nalazi od  $50,6$  do  $77,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $\text{WB.M}_{\text{♂}} = 59,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ovakav uski raspon znači vrlo strogu kontrolu koncentracije u krvi kalcija kao jednog od najvažnijih esencijalnih minerala. Iznad linearnog djela, dakle, iznad vrijednosti u2 odnosno U2 slijedi eksponencijalni dio sigmoidne krivulje koji označava vrijednosti kada mehanizam kontrole nije dovoljan i možemo govoriti o hipersaturaciji bez još manifestne kliničke toksičnosti. Za punu krv nema mnogo podataka o

koncentracijama od drugih istraživača (za razliku od serumu ili plazme), no rang vrijednosti odgovara onima koje su opisali Alimonti i sur.<sup>267</sup> sa medijanom od 65,2  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  te rasponom od 5. do 95. percentile 52,2 – 87,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . U slučaju pune krvi, vrijednosti u mililitrima (ml) i gramima (g) međusobno su usporedive s obzirom da je gustoća krvi gotovo ista kao i gustoća vode<sup>269</sup>.

### 6.3.2 Cink (Zn)

Cink je esencijalni element, a manjak je povezan sa slabijim cijeljenjem rana, usporenim rastom, slabijom percepcijom okusa, noćnim slijepilom, usporenim rastom i gubitkom kose, dermatitisom, aknama, intenzivnijim tjelesnim mirisom i povećanim rizikom od zubnog karijesa. Kada je vrlo visok u kosi može ukazivati na potrebu za više Zn zbog usporenog rasta kose<sup>270</sup>. Momčilović je dokazao da se cink odlaže ne samo u kosu nego i u nokte<sup>271</sup>.

U krvi je prisutan predominantno u eritrocitima; odnos unutarstaničnog cinka naspram plazme je aproksimativno 10:1<sup>236</sup>. Srednje vrijednosti cinka u plazmi za zdrave pojedince iznose od 90-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>268,273</sup>, dok su vrijednosti u serumu oko 16% više od onih u plazmi<sup>274</sup>. Općenito, do sada nije pronađena definitivna korelacija između sadržaja Zn u kosi i plazmi, kosi i eritrocitima te plazmi i eritrocitima. Bilo kakve značajnije korelacije vjerojatnije su uzrokovane slučajno zbog distribucije rezultata i ispitanika po dobi.

Jedna studija pokazala je da su koncentracije Zn u punoj krvi znatno niže u djece zaostale u rastu (8,6 vs. 13,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), a u kosi su bile znatno niže (Zn 157-218  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>275</sup>. Takav konstitucijski usporeni rast odnosi se na deceleraciju blizu ili ispod 3. percentile za visinu i težinu, a starost kostiju prati biološku dob, a ne kronološku

<sup>276</sup>. Kako Zn ima ulogu u normalnom rastu i razvoju (dominantno koštanog sustava) uz ranije navedene minerale, važan je uvid u njegov/njihov nutritivni status.

Kako je ranije navedeno, Zn je jedini od određivanih minerala koji ne pokazuje razlike ovisne o spolu u uzorcima kose. Zajednički medijan u kosi iznosi  $186,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $M_{\text{♂}} = 193,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $M_{\text{♀}} = 184,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Tako se zajednički linearni segment na sigmoidnoj krivulji (Slika 12a) može opisati od oko  $130 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (d2D2 - u2U2), da budemo potpuno precizni za žene  $131,6 - 264,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , za muškarce  $127,0 - 256,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Iznad te vrijednosti kao i ranije postoji povećano odlaganje Zn u kosu koje označava hipersaturaciju organizma cinkom.

Za razliku od kose, koncentracije u krvi razlikuju se ovisno o spolu. Uz *U*-test i  $\chi^2$ -test, visoki stupanj korelacije vrijednosti sa muškim spolom potvrdila je i faktorska analiza u IV. komponenti (eigenvalue 1,499). Muškarci imaju značajno povišene vrijednosti sa medijanom od  $6,53 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  naspram žena kojima je medijan  $5,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Sigmoidne krivulje i u ovom slučaju posjeduju linearne segmente koji održavaju adekvatnu homeostatsku kontrolu, uskog su raspona koncentracija i za žene to je interval od  $4,89$  do  $6,54 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dok je za muškarce od  $5,50$  do  $7,60 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Slika 12c). Ova razlika po spolu nije poznata od ranije, a razlog zašto muškarci nakupljaju više Zn u krvi može se spekulirati jer iako je Zn ekstenzivno istraživani element, kao prijelazni metal igra brojne uloge u organizmu da je gotovo nemoguće sastaviti globalni pregled njegove cijele biokemije.

Ranije studije nude oprečne dokaze po pitanju cinka. Da nema korelacije cinka u krvi i kosi, zaključio je Klevay <sup>236</sup>, a u ukazao na razliku po dobnim skupinama. U istom istraživanju nije nađeno razlike ovisne o spolu ili dobi iz uzoraka plazme. Prema njemu u kosi postoji blaži pad u prvom desetljeću te porast u drugom, da bi se nakon 20. godine vrijednosti ujednačile ovisno o dobi; za muškarce one

iznose 142, a za žene 167  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Navedene vrijednosti značajnije ne odstupaju od ranije prezentiranih od Reinholda i suradnika<sup>277</sup> koji su pokušali usporediti urbanu i ruralnu populaciju.

Naši rezultati usporedivi su sa onima dostupnim u literaturi. Za kosu to su vrijednosti od  $147\pm 41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  po Wolowiec<sup>266</sup>, zatim prema Caroliju  $53,7\text{-}327 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>248</sup> te  $124\text{-}320 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  prema Lyngaru<sup>278</sup>. Vrijednosti u krvi jedan su do dva reda veličine manje – Alimonti navodi  $0,45 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>267</sup>, Momčilović  $4,4\text{-}8,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>278</sup>, Caroli  $4\text{-}8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>248</sup> te Rodushkin  $5,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $3,5\text{-}9,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )<sup>279,280</sup>. Na većem uzorku poljske populacije koja je, kako je ranije navedeno, opisala vrijednosti Ca i Mg, postoji podjela po dobnim skupinama u kosi. Za žene u mlađoj dobi, od 20 do 40 godina starosti medijan je  $185,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a za muškarce  $170,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>29</sup>. U skupini od 40 do 60 godina medijani su  $174,7$  i  $94,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za žene odnosno muškarce<sup>30</sup>. Naši rezultati tu razliku ne mogu potvrditi, no postoji negativna korelacija Zn u kosi sa dobi ispitanika koja je analizom glavnih komponenti značajnije izražena kod žena zajedno sa Ca. Kod muškaraca ta korelacija je naznačena, no statistički nije značajna (faktorsko opterećenje od  $-0,144$ ). Detalji u Tablici 3.

### 6.3.3 Fosfor (P)

Fosfor je u formi fosfatnih iona hidroksiapatita strukturna sastavnica kostiju. Iako je manjak fosfora rijetkost, izolirani slučajevi nedostatne parenteralne prehrane otkrili su da nedostatak može uzrokovati poremećaje kosti, rahitis i osteomalaciju<sup>281</sup>. Neka istraživanja ukazuju na negativne učinke prehrane bogate fosfatima koji uključuju smanjeno stvaranje kosti sa povećanjem resorpcije i poremećajem biomehaničkih svojstava. Rezultati upućuju na mehanizam koji uključuje povećano

izlučivanje paratireoidnog hormona (PTH) <sup>282,283</sup>. Unatoč tome, meta analiza koju je proveo Fenton i sur. <sup>284</sup> ne korelira povišeni unos fosfata sa koštanom demineralizacijom. Štoviše, studija je pokazala da nizak Ca u urinu korelira se retencijom fosfora. Shodno navedenim rezultatima, metabolizam kalcija i fosfora usko je povezan i ne bi se trebao promatrati pojedinačno već u okviru šireg konteksta. Nadalje, fosfati unešeni hranom mogu utjecati na izlučivanje PTH <sup>285</sup>. Prema našim istraživanjima, fosfor je ključan bioelement za formiranje biološke matrice kosti <sup>18</sup>.

Fosfor ne pokazuje značajnu korelaciju u kosi sa gore navedenim elementima, dakle, kalcijem, magnezijem, stroncijem i barijem. Esencijalan je element i ima značajno povišene vrijednosti u muškoj populaciji u kosi. Koristeći model derivata medijana (Slika 13a) može se opisati sigmoidna krivulja sa relativno malim rasapom u nižim vrijednostima i linearnim segmentom od  $D_2 = 121,0$  do  $U_2 = 205,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za muškarce ( $M_{\text{♂}} = 155,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i  $d_2 = 115,7$  do  $u_2 = 197,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za žene ( $M_{\text{♀}} = 141,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Opažena razlika iznosila je manje od 10% ( $\pm 10\%$ ). Isti raspon koncentracija označava što bi bile pretpostavljene normalne vrijednosti u kosi nakon čega slijedi naglo rast koncentracija što bi ukazivalo da je i u ovom slučaju  $D_2$  odnosno  $d_2$  točka nakon koje kompenzacijski regulacijski mehanizmi ne mogu kompenzirati povišeno odlaganje fosfora u kosu. Za fosfor je dokazano da su vrijednosti u kosi konstantne neovisno o populaciji koja je ispitivana <sup>286</sup>. Uspoređeni su medijani koncentracija fosfora iz dvije prospektivne studije u Hrvatskoj (broj ispitanika,  $n_1 = 311$ ,  $n_2 = 761$ ) te po jedne iz Makedonije ( $n = 91$ ), Japana ( $n = 33$ ) i SAD-a ( $n = 271$ ). Kosa je prana koristeći različite procedure, a koncentracije P su analizirane različitim analitičkim instrumentima, uključujući ICP-ES (engl. *Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry*) i ICP-MS u različitim vremenskim intervalima unutar razdoblja od 25 godina. Medijani u svim testiranim skupinama kretali su se  $147\text{--}153 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bez jasne

razlike između muškaraca i žena <sup>286</sup>. I drugi autori navode isti red veličine rezultata: Wolowiec 172-213  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>266</sup>, te Rodushkin 102-169  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s medijanom od 134  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>268</sup>. Analitička varijabilnost P u kosi očigledno je zanemariva i nevezana za moguće vanjske čimbenike. Fosfor u kosi odražava konstantnu stopu sinteze proteina vlasi iz replikacije fosfatne okosnice DNK <sup>287</sup>. S obzirom na naše rezultate, djelomično je i odraz intermedijarnog metabolizma.

U punoj krvi razlika ovisna o spolovima nije na razini statističke značajnosti da se može o njoj govoriti sa sigurnošću, iako muškarci pokazuju više vrijednosti bez statističke značajnosti. Često je određivan element i u kliničkoj praksi (u serumu), no bez jasnih razlika ovisnih o spolu <sup>112</sup>. Za naglasiti je da je ovo jedini slučaj gdje je koncentracija ispitanih elemenata u krvi veća od one u kosi. Dio sigmoidne krivulje (Slika 13b) koji opisuje linearni segment nalazi se u rasponu vrijednosti u punoj krvi od 332,0 do 418,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $M_{\text{♂}} = 386,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za muškarce i od 316 do 452  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $M_{\text{♀}} = 366,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za žene. Vrijednosti su usporedive sa rezultatima ranijih istraživanja, štoviše, zajednički medijan ( $M_{\text{♂+♀}} = 372,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) gotovo je identičan medijanu od 375  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  sa rasponom od 325-455  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  <sup>279</sup>. Fosfor je i u krvi postojan po pitanju raspona normalnih vrijednosti i medijana kod zdravih osoba ukazujući na snažan kompenzacijski homeostatski mehanizam i zanemariv utjecaj okolišnih čimbenika.

#### 6.3.4 Magnezij (Mg)

Magnezij je esencijalan element za zdravlje ljudi koji slijedi isti obrazac odlaganja u kosu, a koji ujedno i snažno korelira s kalcijem. U prilog tome da je metabolizam magnezija usko vezan uz kalcij govori i podatak da se 50-60% od 25 g magnezija (koliko se nalazi u ljudskom tijelu) nalazi u kostima <sup>113</sup>. Po istom modelu

kako za Ca tako i za ostale elemente opisana je krivulja potencije. Sigmoidna krivulja za Mg u kosi (Slika 14a) na linearnom srednjem segmentu za žene d2-u2 (68,7 – 505,9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $\text{H.M}_{\text{♀}} = 192,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i za muškarce D2-U2 (35,6 – 149,1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $\text{H.M}_{\text{♂}} = 56,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). I u ovom slučaju označava raspon koncentracija Mg u kosi koji odgovara adekvatnom nutritivnom statusu. Vrijednosti iznad linearnih raspona ( $>u_2$ ,  $>U_2$ ) koje opisuju eksponencijalne krivulje, kao i u slučaju kalcija, mogu označavati patološki metabolizam kosti, a ispod donje granice ( $<d_2$ ,  $<D_2$ ) izraženiji deficit elementa. Dobivene vrijednosti u ovom radu u skladu su sa literaturnim podacima po pitanju raspona i reda veličine koncentracija Mg u kosi. Wolowiec i sur. navode 33-113  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>266</sup>, Caroli 1,49-567  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>248</sup>, a Rodushkin 8,5-141  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $\text{M}_{\text{♀+♂}} = 32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>268</sup>. Nešto niže vrijednosti uz spolnu razliku vidljivu u rasponu dobi od 20 do 40 godina (žene  $\text{M}_{\text{♀}} = 35,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , raspon 7,0-300,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; muškarci  $\text{M}_{\text{♂}} = 25,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , raspon 3,7-287,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) navodi i ranije spomenuti poljski autori<sup>29</sup>. U skupini starijih ispitanika razlika ovisna o spolu izostaje (žene  $\text{M}_{\text{♀}} = 30,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , raspon 5,75-215,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; muškarci  $\text{M}_{\text{♂}} = 29,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , raspon 5,75-240,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>30</sup>. Koje bi bile vrijednosti Ca i Mg u kosi u smislu toksičnosti još treba razjasniti.

Statistički ne postoji razlika u koncentracijama magnezija između muškaraca i žena u punoj krvi ( $\text{WB.M}_{\text{♂}} = 31,35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $\text{WB.M}_{\text{♀}} = 31,51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Opisane krivulje u krvi u slučaju ovog elementa praktički su identične kao i u slučaju za kalcij (Slika 14b). Linearni segment koji može opisati pravac u uskom je rasponu koncentracija (žene 27,78 – 37,21  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , muškarci 27,72 – 38,78  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Oba eksponencijalna segmenta koji se nalaze ispod, odnosno iznad tih vrijednosti također su u izrazito uskom rasponu što ukazuje na minimalna odstupanja razine Mg u punoj krvi. Vidimo da literaturni podaci u kojima medijan iznosi  $32,7 \pm 1,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>257</sup> ne odstupaju od naših.

### 6.3.5 Silicij (Si)

Još jedan element koji pokazuje isti obrazac odlaganja u kosu, a pokazuje efekt „kalcijskog paradoksa“ prilikom suplementacije kalcijem, magnezijem i vitaminom D, je silicij<sup>18</sup>. Odlaganje silicija u kosu počinje ranije kod mušaraca (Slika 15a) kod kojih se linearni segment nalazi u rasponu 10,5 – 47,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $\text{H.M}_{\delta} = 21,87 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), dok je kod žena 16,6 – 106,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $\text{H.M}_{\text{♀}} = 34,49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Unatoč značajnosti silicija za zdravlje organizma, u literaturi postoji vrlo ograničen broj podataka u smislu normalnih vrijednosti. U tom smislu za naglasiti je medijan od 25  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  uz raspon koncentracija <4,6-132  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  koji je objavio Rodushkin<sup>268</sup> od čega naše vrijednosti ne odstupaju s time da je naš broj ispitanika gotovo dvostruki u odnosu na švedske autore. Silicij je esencijalni element u pogledu koštanog zdravlja kao što su to Ca i Mg. Životinje sa deficitom silicija razvijale su koštane poremećaje, reduciranu sintezu kolagena i proteina za izgradnju kosti<sup>288</sup>. Iako biokemijski mehanizmi putem kojih Si djeluje nisu razjašnjeni, zna se za neke neposredne učinke nedostatka Si na druge elemente. Izraženo je smanjenje koncentracije Ca, Mg, Cu, Mn i Mo u kosti kada postoji nedostatak silicija u hrani<sup>289</sup>, a također, Si uzrokuje i smanjenje koncentracije Mg, Ca, P i Zn u jetri<sup>290</sup>.

U punoj je krvi 20 ispitanika (14 žena, 6 muškaraca) imalo koncentracije ispod razine granice detekcije od 0,12  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  tkiva. Iz tog razloga u krivulji derivata medijana nedostaju vrijednosti niže od d1 (0,360  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za žene, odnosno D2 (0,383  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za muškarce (Slika 15c). Vrijednosti su određene u preostalom uzorku od 138 ispitanika (74 žena, 64 muškarca) kojima su određeni medijani odnosno njihovi derivati te po opisanom modelu stvorena sigmoidna krivulja. U ovom slučaju postoji razlika u smislu da muškarci ( $\text{WB.M}_{\delta} = 1,740 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) imaju više vrijednosti Si u krvi



od žena ( $WB.M_{\text{♀}} = 0,980 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) no ista statistički nije značajna. Linearni segment u ovom slučaju (d1-u2) za žene u rasponu je od 0,360 do 2,820  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a za muškarce (D2-U2) od 0,383 do 11,967  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Najniže vrijednosti tog dijela krivulje ujedno su i najniže vrijednosti krivulje. Općenito gledano Si u krvi pokazuje široki raspon vrijednosti od više od dva reda veličine. Razlika ovisna o spolu do sada nije bila poznata, a vrijednosti u literaturi od različitih autora nisu koherentne po pitanju srednjih vrijednosti odnosno referentnih intervala. Tako Alimonti <sup>267</sup> navodi medijan od 0,142  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , s referentim intervalom normalnih vrijednosti od 0,085 – 0,277  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , što je po pitanju medijana usporedivo, no za normalne vrijednosti definira užu raspon. Nadalje, niže vrijednosti od 0,0242 do 0,0743  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  navodi i Lugowski <sup>291</sup>. Usporedivo s našima, rezultati su analize vrijednosti Si u švedskoj populaciji - 0,23-1,6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  <sup>280</sup>. Široki raspon vrijednosti, kako u literaturi, tako i u našoj populaciji znači da je teško definirati koji bi bio esencijalni minimum, a iznad kojih vrijednosti počinje moguća toksičnost. Korelacija sa drugim elementima koji čine kost u skladu je i sa time da silicij unesen hranom može imati pozitivne učinke na mineralizaciju kosti, osobito kortikalne <sup>182</sup>.

### 6.3.6 Stroncij (Sr)

Još uvijek nije razjašnjeno je li stroncij esencijalan ili nije i je li preveliko opterećenje anorganskim solima stroncija štetno za zdravlje kosti <sup>188</sup>. Unatoč tome, organske soli stroncija kao što je stroncijev ranelat potencijalno su dobar kandidat za liječenje osteoporoze. Potiču anaboličke učinke stroncija na kost i pomažu u prevenciji fraktura. Istraživanja *in vitro* i *in vivo* su pokazala da stroncij povećava stvaranje hrskavičnog matriksa, stimulira proliferaciju osteoblasta, potiče

mineralizaciju kosti i inhibira diferencijaciju osteoklasta kao i njihovu resorptivnu sposobnost<sup>292,293</sup>. Skoryna<sup>294</sup> prvi je dokazao farmakološka svojstva stabilnog i <sup>89</sup>Sr radiofarmacijskog izotopa Metasteron®<sup>295</sup> u smanjenju boli kod koštanih metastaza karcinoma dojke i prostate.

Uz to što pokazuje snažnu korelaciju sa Ca i Mg, u slučaju stroncija isto kao i kod prethodno navedenih elemenata žene imaju značajno više vrijednosti u kosi. Medijan za žene ( $M_{\text{♀}}$ ) je  $3,490 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dok je kod muškaraca ( $M_{\text{♂}}$ )  $1,156 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Raspon koncentracija na sigmoidnoj krivulji (Slika 16a) kroz koji se može povući pravac nalaze se između  $1,093$  i  $7,411 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  kod žena (d2-u2) i  $0,433$  i  $3,315 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  kod muškaraca (D2-U2). Navedene vrijednosti u potpunosti su u skladu sa prethodnim istraživanjima: aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška od  $2,51 \pm 2,09 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>266</sup>, raspon dobivenih koncentracija  $1,7$ - $8,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>248</sup>, medijan od  $0,97 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  i raspon koncentracija  $0,14$ - $5,54 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>268</sup>. Slično ponašanje kao i Ca može se objasniti time što ljudsko tijelo absorbira i izlučuje Sr na isti način kao i Ca<sup>296</sup>. Tako vrijednosti u kosi mogu biti reprezentativne u pogledu statusa organizma ako se gleda u okviru zajedničke matrice zajedno sa drugim elementima.

Očekivano, kako i u slučaju Ca i Mg, Sr u krvi nalazi se unutar uskog raspona vrijednosti, gotovo cijela krivulja ne odstupa značajnije od osnovne linearne funkcije kakva je opisana ranije za raspon derivata medijana d2 – u2 ( $0,0099$  –  $0,0199 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i D2 – U2 ( $0,0096$  –  $0,213 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Slika 16b). Nema razlike ovisne o spolu ( $WB.M_{\text{♀}} = 0,0137 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $WB.M_{\text{♂}} = 0,0142 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Kako je stroncij jedan od češće istraživanih elemenata u tragovima, a bez klinički značajne funkcije u smislu elektrolita da bi se standardno određivao iz seruma, dostupniji su i podaci o vrijednostima u punoj krvi. I te su vrijednosti usporedive s našima – medijan od  $0,0255 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  i referentni interval od  $0,0101$  –  $0,0503 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>267</sup>, medijan od  $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , raspon vrijednosti of  $0,009$

– 0,041  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>297</sup> i medijan 0,012  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s rasponom vrijednosti 0,007 – 0,025  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>278,279</sup>.

### 6.3.7 Bor (B)

Bor nije opisan kao esencijalan element zbog toga što niti jedna biološka funkcija nije neposredno vezana uz njega iako se zna da potiče aktivnost mnogih enzima<sup>298</sup>. Brojne studije demonstrirale su djelotvornost bora na koštano zdravlje, uključujući rast, čvrstoću i tvrdoću, mehanička svojstva i mikroarhitekturu trabekularne kosti<sup>299-301</sup>. Zanimljivo je da je prevalencija artritisa niža u područjima gdje je dnevni unos bora 3 do 10 mg u usporedbi s područjima gdje je dnevna konzumacija 1 mg ili manje<sup>300</sup>.

Bor je također mikroelement koji u kosi pokazuje značajnu razliku ovisnu o spolu. Naša muška populacija ispitanika ga ima više ( $M_{\text{♂}} = 1,623 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $M_{\text{♀}} = 0,860 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Raspon koncentracija je u ovom slučaju dosta širok, čak kroz tri reda veličine (Slika 17a). Tako i segmenti krivulje koji se daju opisati linearno (d2-u2, D2-U2) dosta su širokog raspona i za žene isnose 0,434 – 2,570  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a za muškarce 0,578 – 4,766  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . S obzirom da bor nije esencijalan element, u ovom rasponu možemo govoriti o tolerabilnom rasponu, a iznad koncentracija u kosi od 2,570 za žene i 4,766  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za muškarce o potencijalnoj hipersaturaciji. Smatramo da je glavna biološka uloga bora u stvaranju matriksa kose i kosti. Rezultati su usporedivi sa ranije opisanima: prema Wolowiec 2,71±2,27  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>266</sup>; Goullé navodi 0,26-1,87  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>297</sup>; 0,13-3,30  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , a Rodushkin medijan od 0,46  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>268</sup>.

Za razliku od ostalih elemenata u punoj krvi imamo sličnu situaciju u smislu da je medijan veći za muškarce nego za žene kao što vidimo i u kosi ( $M_{\text{♂}} = 0,0523 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

<sup>1</sup>,  $M_{\text{♀}} = 0,0358 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Ta razlika nije statistički značajna, a raspon koncentracija uključujući i krajnje točke rasapa kreće se kroz dva reda veličine (Slika 17c).

Odvojeno opisani središnji segmenti (linearni) nalaze se između  $0,018$  i  $0,076 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za žene i  $0,024$  i  $0,145 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za muškarce. Kako nema statistički značajne razlike, zajednička (za oba spola) vrijednost bora u punoj krvi gdje prestaje linearni segment i krivulja ponovno dobiva eksponencijalni uzlazni tijek iznosi oko  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Iznad te točke možemo govoriti o hipersaturaciji organizma borom. U punoj krvi zajednički medijan za B iznosi  $0,0393 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $0-1,139 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) što je dva reda veličine manje nego u kosi. Dosadašnja istraživanja navode sličnu srednju vrijednost ( $0,031 \pm 0,0056 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>278</sup>, odnosno medijane uz nešto užu raspon koncentracija od 5. do 95.

percentile:  $0,014-0,044 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s medijanom od  $0,026 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>297</sup> i  $0,006-0,033 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ <sup>279</sup>.

### 6.3.8 Barij (Ba)

U kosi, najsnažniju korelaciju uz kalcij, magnezij i stroncij (bivarijatna korelacija, faktorska analiza) ima barij koji je toksičan u većim količinama, a ne esencijalan, ali evidentno prati druge esencijalne elemente sa definiranom funkcijom u koštanom metabolizmu. Kod Ba linearne segmente sigmoidnih krivulja (žene  $0,340 - 2,536 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $H.M_{\text{♀}} = 0,960 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , muškarci  $0,263 - 1,193 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $H.M_{\text{♂}} = 0,523 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) treba definirati kao tolerabilan raspon izloženosti u okolišu (Slika 18a). Dio krivulje opisan kao d2-d6 i D2-D6 nalazi se ispod donje granice tog tolerabilnog raspona i označava nisku izloženost Ba u okolišu odnosno hrani. Analogno tome, povišene vrijednosti u kosi koje se nalaze iznad granica u2 i U2 (u2-u6, U2-U6) definirali smo kao raspon pretjerane izloženosti (povišeno opterećenje organizma,

engl. *body burden*). Ne zna se točan prag (engl. *threshold*) koji bi značio potencijalnu odnosno manifestnu toksičnost barija. Muškarci počinju nakupljati Ba u kosi ranije od žena te vrijednost u kojoj linearni segment postiže maksimum je shodno tome niža u smislu da žene više odlažu tog elementa u kosu. Moguće je da žene imaju veću apsorpciju barija iz hrane s obzirom na jednaku izloženost u odnosu na muškarce. Naše predložene maksimalne tolerabilne vrijednosti za Ba u kosi izose  $2,54 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za žene i  $1,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  za muškarce. U prilog tomu idu i podaci dostupni u literaturi koji su usporedivi s našima; medijan  $0,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sa rasponom vrijednosti od  $0,16-1,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  prema Rodushkinu<sup>268</sup> i  $0,76-1,41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  prema Caroliju<sup>248</sup> te srednja vrijednost sa standardnom pogreškom  $0,97\pm 1,29 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  po Wolowiec<sup>266</sup>.

Po pitanju barija u krvi, a za razliku od kose, muškarci ( $\text{WB.M}_{\text{♂}} = 0,0406 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) imaju značajno više vrijednosti od žena ( $\text{WB.M}_{\text{♀}} = 0,0238 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) uz razmjerno široki raspon vrijednosti preko tri reda veličine (Slika 18b). Takav raspon znači različitu izloženost bariju u okolišu, a nepoznato je kako se organizam nosi s povišenom koncentracijom barija. Nalazi govore u prilog teoriji da je kapacitet žena za regulaciju Ba veći od muškaraca koji imaju ukupno širi raspon koncentracija od najniže do najviše vrijednosti kao i veći raspon graničnih koncentracija linearnog segmenta sigmoidne krivulje ( $D2-U2 = 0,021 - 0,062 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) za razliku od žena ( $d2-u2 = 0,019 - 0,046 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Tim više što im je početna vrijednost ovog (tolerabilnog) raspona aproksimativno jednaka ( $D2 \approx d2$ ). Rezultati su usporedivi sa onima koje je objavio Goullé<sup>297</sup> sa medijanom od  $0,059 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  i rasponom  $0,0464-0,0776 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a za red veličine manji nego Alimonti<sup>267</sup> sa medijanom od  $0,00113 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  što ukazuje na različitu izloženost populacije. Međutim, može ukazivati i na razlike u postupcima razlaganja biološke matrice.

## 6.4 Zaključna rasprava

Nakon dosta usavršavanja, prevladavajuće je suglasje da je kosa vrijedan uzorak za procjenu nutritivnog metaboličkog statusa i procjenu toksičnosti na neinvazivan način<sup>11,13,14,23,261-267</sup>. Ne postoje definitivni standardi za normalne vrijednosti elemenata u kosi za razliku od krvi i to samo nekih, uglavnom elektrolita koji se koriste u kliničkoj praksi. Ova metoda konstrukcije sigmoidnih krivulja omogućava nam nov način prikaza i shvaćanja metabolizma elemenata. Do sada korišteni su unaprijed stvoreni matematički modeli koji su mehanički implementirani na sustav izmjerenih vrijednosti. Vrijednost ovog istraživanja je i u tome da se umjesto takvog shvaćanja, metoda analize i prikaza podataka prilagodi dobivenim podacima izvodeći derivate medijana. Ova metoda nudi nov način precizne analize uzoraka velike nerazdvojive varijabilnosti i distribucije frekvencija populacije koja nije normalna distribucija kada se prikazuje na standardan linearan način.

Vrijednosti koje se nalaze u krajevima krivulja i koje hipotetski označavaju hipo- odnosno hipersaturaciju uz eventualnu mogućnost postojanja klinički latentne toksičnosti tek treba istražiti.

Uz ovu i druge metode korištene u istraživanju za većinu elemenata (iznimka je Zn) dokazana je razlika ovisna o spolu koju pak u većini slučajeva nije vidljiva u uzorcima krvi. Jednodimenzionalan rast i nepovratno odlaganje elemenata u takvu biomatricu čine ga osjetljivim na minimalne i kratkotrajne oscilacije tvari koje su prisutne u organizmu nakon čega ostaju zapisane u vlasi kose kao na vremensku traku. Uzimanje duljeg uzorka znači i dulji vremenski period promatranja, odnosno srednju vrijednost cijelokupnog promatranog perioda. Naše istraživanje ukazuje i na

potrebu razlikovanja biološke matrice kose i kosti od mineralizirane biološke matrice kose i kosti.

Ovakav model predstavlja novi koncept određivanja statusa osteotropnih elemenata u ljudskoj populaciji uz različite intervale normalnih vrijednosti ovisno o spolu. Koncept određivanja adekvatnog ili tolerabilnog raspona suštinski je potpuno drugačiji od dosadašnjih sustava i načinja određivanja graničnih vrijednosti.

Ono što je dodatno uočeno jest da se kosa javlja kao neposredan individualni odgovor primjeren najboljem mogućem prehrambenom upitniku (engl. *dietary questionnaire* ili *interview*) za procjenu nutritivnog statusa ili izloženosti bioelementima u čovjekovoj okolini.

## 7 ZAKLJUČAK

Ovo je istraživanje potvrdilo činjenicu kako je kosa složeni biopolimer (keratin) u koji se uz konstantan rast postupno i ireverzibilno odlažu različiti bioelementi u različitim koncentracijama i različitim međusobnim omjerima. To kosu čini pogodnim dugoročnim organskim bioindikatorom za procjenu metaboličkog nutritivnog statusa bioelemenata. Za razliku od toga, puna je krv kratkoročni bioindikator gdje je razina bioelemenata podložna stalnoj metaboličkoj ekvilibraciji sa svim tkivima i organima kroz koja krv prolazi.

Analiza nakupljanja bioelemenata u kosi i krvi (u padajućem nizu  $\text{Ca} > \text{Zn} > \text{P} > \text{Mg} > \text{Si} > \text{Sr} > \text{B} > \text{Ba}$ ) pokazala je da je njihova koncentracija značajno viša u kosi nego u krvi. Ta činjenica kosu čini pogodnijom organsko biološkom matricom za kemijsku analizu bioelemenata nego što je to puna krv. Jedino je koncentracija fosfora u krvi bila viša od one u kosi zbog relativno visokog sadržaja proteina niske molekulske mase u cirkulirajućoj krvi.

Elementi iz skupine 2A Periodičkog sustava  $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Sr} > \text{Ba}$ , kao i Si, koji je izvan te skupine, preferentni su osteotropni elementi, neophodni u mineralizaciji kose kao organske bioloske matrice. Istodobno su  $\text{Zn} > \text{P} > \text{B}$  osnovni elementi upravo u stvaranju toga organskog biološkog matriksa koji služi kao neophodni supstrat mineralizacije.

Analizirajući frekvenciju distribucije ispitanih bioelemenata u kosi, metodom derivata medijana, po prvi puta su jasno definirani adekvatni rasponi koncentracije bioelemenata u kosi (referentne vrijednosti) za elemente Ca, Zn, P, Mg, Si, Sr, B, i Ba i punoj krvi (Si, Sr, B, Ba). Istodobno, precizirane su i granično niske koncentracije ispitanih bioelemenata ispod kojih govorimo o deficitu, kao i povišenim vrijednostima



kada govorimo o eksczesnoj izloženosti nekom elementu. Ovo istraživanje učinilo je bitan iskorak u smislu određivanja vrijednosti iskazane kao raspon odgovarajućih referentnih fizioloških koncentracija nekog elementa u kosi i krvi. Za razliku od dosadašnjeg načina jednoznačajnog određivanja neke granične vrijednosti.

Osobito značajnim smatramo nedvosmisleni nalaz povišenih koncentracija elemenata 2A skupine Periodičkog sustava  $Ca > Mg > Sr > Ba$  u kosi žena naspram kose muškaraca. Pri tomu je omjer između medijana navedenih bioelemenata unutar istoga spola bio konstantan. Očigledno je kako je metabolička kontrola mineralizacije organske biološke matrice kose bitno različita između muškaraca i žena. Analizom elemenata u uobičajenoj kliničkoj biološkoj matrici, tj. u krvi, nismo opazili takve razlike.

Rezultati ovdje iznesenih istraživanja o kvalitetnim referentnim vrijednostima predstavljaju inovativni doprinos primjeni analize multielementnih profila kose i krvi (osobito kose) za potrebe procjene nutritivnog statusa ljudskog organizma, u kliničkoj praksi za dijagnostiku metaboličkih poremećaja te u preventivnoj i personaliziranoj medicini.

Promjene u metabolizmu vezane uz dob i spol, javno su zdravstveni i klinički problem. Potrebni su pouzdani bioindikatora za individualnu procjenu metaboličkog statusa bioelemenata, a krv i kosa lako su dostupna tkiva prikladna za određivanje metaboličkog statusa bioelementnih profila osteotropnih elemenata.

U istraživanje multi-bioelementnog profila osteotropnih elemenata bila su uključena 192 ispitanika (83 muškarca, 109 žena). Uzorci su analizirani metodom ICP-MS i izdvojeni su oni bioelementi sa ulogom u metabolizmu kosti: B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr i Zn. Analiza nakupljanja bioelemenata u kosi i krvi (Ca>Zn>P>Mg>Si>Sr>B>Ba) pokazala je da je njihova koncentracija značajno viša u kosi nego u krvi. To kosu čini pogodnijom organsko-biološkom matricom od krvi za kemijsku analizu bioelemenata.

Analizirajući frekvenciju distribucije metodom derivata medijana, po prvi puta su jasno definirani adekvatni rasponi koncentracije bioelemenata u kosi i punoj krvi. Istodobno, precizirane su i granično niske koncentracije ispitanih bioelemenata ispod kojih govorimo o deficitu, kao i povišenim vrijednostima kada govorimo o prekomjernoj izloženosti nekom elementu.

Osobito značajnim smatramo nalaz povišenih koncentracija elemenata skupine 2A Periodičkog sustava (Ca>Mg>Sr>Ba) u kosi žena naspram kose muškaraca. Pri tomu je njihov omjer unutar istoga spola bio konstantan. Očigledno je kako je metabolička kontrola mineralizacije organske biološke matrice kose bitno različita između muškaraca i žena. Analizom elemenata u krvi, nismo opazili takve razlike.

## GENDER DEPENDENT DIFFERENCES IN OSTEOTROPHIC ELEMENTS IN HUMAN HAIR AND BLOOD

Metabolic changes related to age and gender are becoming a public health and clinical problem. Reliable bioindicators for individual assessment of bioelement metabolic status are needed. Blood and hair are two easily accessible tissues suitable for metabolic status assesment.

The study included 192 subjects (83 men, 109 women). The samples were analyzed with the ICP-MS highlighting the osteotrophic elements (B, Ba, Ca, Mg, P, Si, Sr, and Zn) as the primary research objectives. The accumulation of bioelements (Ca>Zn>P>Mg>Si>Sr>B>Ba) appeared significantly higher in the hair than the blood. This fact makes hair a more suitable biological matrix for chemical analysis of the studied elements than whole blood.

For the first time the normal concentration ranges of bioelements were defined by analyzing the frequency distribution properties in the hair and whole blood. At the same time, the concentration limits for bioelement deficiency and excess were defined.

Especially significant is the finding of higher concentrations of elements belonging to the 2A group of the Periodic table of elements (Ca>Mg>Sr>Ba) in women's hair compared to men's. The ratio of osteotrophic bioelements within the same gender remained unchanged. Evidently, the metabolic control of mineralization of the organic biological matrix differs substantially between the genders. No such differences were observed in the whole blood.

## 10 LITERATURA

1. Heymsfield SB, Baumgartner RN. Body composition and anthropometry, Ch. 49. U: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, ur. Modern nutrition in health and disease, 10. izd. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007, str. 751-770.
2. Forrester JM, ur. Body composition and nutritional requirements. U: Companion to medical studies (anatomy, biochemistry and physiology), 3. izd., Ch.1. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1985, str. 1.1-1.34.
3. Beers MH, Berkow R, ur. Geriatric medicine. U: The Merck manual of diagnosis and therapy, 17. izd., Sect. 21, Ch. 293. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories; 1999, str. 2503-2516.
4. Cox TM. Iron metabolism and its disorders. U: Warrell DA, Cox TM, Firth JD, Benz EJJr, ur. Oxford Textbook of Medicine, 4. izd., Vol 3, Ch. 22.5.4. Oxford, UK: Oxford University Press; 2003, str. 648-657.
5. Momčilović B, Morović J, Prejac J, Morović S, Sitar-Srebočan V, Skalny V A, Skalnaya G M. Gender dependent homology of the human hair and whole blood multielement profile. 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals. Pucon, Chile: TEMA13; 2008, str. 139.
6. Passwater AR, Cranton ME. Trace elements, hair analysis and nutrition. New Canaan, CT: Keats Publishing; 1983.
7. Momčilović B. Poremećaji prometa elemenata u tragovima. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 222-228.
8. Prasad A, ur. Trace elements in human health and disease, Vol 1 i 2. New York, NY: Academic Press; 1976.

9. Underwood JE, ur. Trace elements in human and animal nutrition. New York, NY: Academic Press; 1977.
10. World Health Organisation. Trace elements in human nutrition and health. Geneva, Switzerland: WHO; 1996.
11. Chattopadhyay A, Roberts TM, Jervis RE. Scalp hair as a monitor of community exposure to lead. Arch Environ Health 1977;32:226-236.
12. Hordinsky, MK. Alopecias. U: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, ur. Dermatology. Edinburgh, UK: Mosby; 2003, str. 1033-1059.
13. Jacob RA, Klevay ML, Logan MG. Hair as a biopsy material. Am J Clin Nutrition 1978;31:477-480.
14. Chatt A, Katz SA. Hair Analysis. Weinheim, Germany: VCH Publishers Inc.; 1988.
15. Watts DL. Hair tissue mineral analysis (HTMA) – Usefull as a metabolic indicator. Trace Element Inc. Newsletter 2005;16:1-4.
16. Boivin G, Cournot G. Manifestations osseuses et articulaires des intoxications métalliques et métalloïdiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 2001;14-025-R-10:8.
17. Elinder F, Arhem P. Metal ion effects on ion channel gating. Q Rev Biophys 2004;36:273-427.
18. Prejac J, Čelebić A, Stipetić-Ovčariček J, Poljak-Guberina R, Nola-Fuchs P, Skalny VA, Skalnaya GM, Momčilović B. Congruency and divergency of calcium in the biological matrice of the human hair with the other osteotrophic and non-osteotrophic members of the multielement profile. 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals. Pucon, Chile: TEMA13; 2008, str. 138-139.

19. Emsley J. The elements of murder – A history of poison. Oxford, UK: Oxford University Press; 2005.
20. Lenihan J. The crumbs of creation. Bristol, UK: IOP Publishing; 1988.
21. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Hair analysis panel discussion: Exploring the State of Science. Appendix C: Pre-Meeting Comments. June 6, 2001.  
[http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair\\_analysis/appendix\\_c.html](http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis/appendix_c.html).
22. Momčilović B, Prejac J, Ivičić N. A case report on analytical reproducibility of the hair multielement profile. A two years follow up. Trace Elem Med (Moscow). 2009;10(1-2):33-38.
23. Miekeley N, de Carvalho-Fortes LM, Porto da Silveira CL, Lima MB. Elemental anomalies in hair as indicators of endocrinologic pathologies and deficiencies in calcium and bone metabolism. J Trace Elem Med Biol 2001;15:46-55.
24. Kelly PJ, Twomey L, Sambrook PN, Eisman JA. Sex differences in peak adult bone mineral density. J Bone Miner Res. 1990;5(11):1169-75.
25. Tsai KS, Pan WH, Hsu SH, Cheng WC, Chen CK, Chieng PU, Yang RS, Twu ST. Sexual differences in bone markers and bone mineral density of normal Chinese. Calcif Tissue Int 1996;59(6):454-60.
26. Jenkins, D. Biological monitoring of toxic trace metals. Volume 2. Toxic trace metals in plants and animals of the world. Part 1. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/3-80/090 (NTIS PB81103483), 1980.
27. International Atomic Energy Agency. The Significance of Hair Mineral Analysis as a Mean for Assessing Internal Body Burdens of Environmental Pollutants, IAEA Publication I.A.E.A. NAHRES-18, IAEA, Vienna, 1993.

28. Kratz A, Sluss PM, Januzzi JL, Lewandowski KB. Appendix A: Reference values for laboratory tests. U: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, ur. Harrison's principles of internal medicine. 2005, A-1—A-9.
29. Dunicz-Sokolowska A, Długaszek M, Radomska K, Właźlak E, Surkont G, Graczyk A. Contents of bioelements and toxic metals in the Polish population determined by hair analysis. Part III. Adults aged 20 to 40 years. *Magnes Res* 2007;20(1):43-52.
30. Dunicz-Sokolowska A, Właźlak E, Surkont G, Radomska K, Długaszek M, Graczyk A. Contents of bioelements and toxic metals in the Polish population determined by hair analysis. Part IV. Adults aged 40 to 60 years. *Magnes Res* 2007;20(2):136-47.
31. Długaszek M, Szopa M, Rzeszotarski J, Karbowski P. Magnesium, calcium and trace elements distribution in serum, erythrocytes, and hair of patients with chronic renal failure. *Magnes Res* 2008;21(2):109-17.
32. Song CH, Barrett-Connor E, Chung JH, Kim SH, Kim KS. Associations of calcium and magnesium in serum and hair with bone mineral density in premenopausal women. *Biol Trace Elem Res* 2007;118(1):1-9.
33. Malter R, Rendon C, Aalund R. A developmental study of sex differences in hair tissue mineral analysis patterns at ages six, twelve and eighteen. *J Orthomol Med.* 2005;20(4):245-254.
34. Tavakkoli A, Ahmadiyar A, Shirini R. Determination of Hair Element Content in Iranian Population Using INAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 2000;243(3):731-735.
35. Pfeiffer C, Mailloux R. Excess copper as a factor in human diseases. *J Orthomol Med.* 1987;2/3:171-182.

36. Prejac J, Višnjević V, Skalny AA, Grabeklis AR, Mimica N, Momčilović B. Hair for a long-term biological indicator tissue for assessing the strontium nutritional status of men and women. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017;42:11-17.
37. Maugh TH. Hair: A diagnostic tool to complement blood, serum, and urine. *Science* 1978;202:1271-1277.
38. Laker M. On determining trace element levels in man: The uses of blood and hair. *The Lancet* 1982;31:260-263.
39. Sanford, MK. *Investigation Of Ancient Human Tissue; Chemical Analyses in Anthropology*. Langhorne, Pennsylvania: Gordon and Breach Science Publishers, 1993.
40. Sanford MK, Kissling GE. Multivariate Analyses of Elemental Hair Concentrations From a Medieval Nubian Population. *Am J of Phys Anth* 1994;95:41-52.
41. Bergfield RA. *Dietary analysis of archeological hair samples from Peru*. Thesis. University of Missouri-Columbia, 2007.
42. Momčilović B, Prejac J, Višnjević V., Skalnaya M. G., Drmić S., Mimica N., Brundić S., Skalny A. V. Gender dependent differences in hair calcium, potassium, magnesium, sodium, phosphorus and zinc. 5th International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM 5). Avignon, France: 2013; May 22-24.
43. Prejac J, Ivičić N, Momčilović B. Hair calcium paradox – a report of the two cases of a controlled intermittent dietary calcium, magnesium and vit D supplementation. *Trace Elem Electrolytes* 2008;25:191-194.
44. Marumo F, Tsukamoto Y, Iwanami S, Kishimoto T, Yamagami S. Trace Element concentrations in hair, fingernails and plasma of patients with



- chronic renal failure on hemodialysis and hemofiltration. *Nephron* 1984;38:267-272.
45. Momčilović B, Lykken I G, Morović J, Skalny AV, Ivičić N. Multielement hair profile (MHP) for early detection of bone osteoporosis in men and women. 12th International Symposium on Trace Elements in Men and Animals. Coleraine, Northern Ireland: TEMA12; 2005, str 63.
  46. Nowak B. Contents and relationship of elements in human hair for a non-industrialised population in Poland. *Science of The Total Environment* 1998;209:59-68.
  47. Bertazzo A, Costa C, Biasiolo M, Allegri G, Cirrincione G, Presti G. Determination of copper and zinc levels in human hair. *Biological Trace Element Research* 1996;52:37-53.
  48. Argust P. Distribution of boron in the environment. *Biol Trace Elem Res.* 1998; 66:131–143.
  49. Sabuncuoglu BT, Kocaturk PA, Yaman Ö, Kavas GO, Tekelioglu M. Effects of subacute boric acid administration on rat kidney tissue. *Clin Toxicol (Phila)* 2006;44(3):249–253.
  50. Kabu M, Akosman MS. Biological effects of boron. U: Whitacre DM, ur. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, NY, USA: Springer Science+Business Media; 2013, str. 57-75.
  51. Hunt CD. One possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biol Trace Elem Res* 1998; 66:205–225.
  52. Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB J.* 1987;1(5):394-7.

53. Naghii MR, Mofid M, Asgari AR, Hedayati M, Daneshpour MS. Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *J Trace Elem Med Biol* 2011;25(1):54-8.
54. Nielsen FH, Shuler TR, Zimmerman TJ, Uthus EO. Magnesium and methionine deprivation affect the response of rats to boron deprivation. *Biol Trace Elem Res* 1988;17:91-107.
55. Nielsen F.H. Other elements: Sb, Ba, B, Br, Cs, Ge, Rb, Ag, Sr, Sn, Ti, Zr, Be, Bi, Ga, Au, In, Nb, Sc, Te, Tl, W. U: Mertz W, ur. Trace elements in human and animal nutrition, 5th ed. Vol. 2. Orlando FL, USA: Academic Press; 1986, str. 415.463.
56. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Boron. Atlanta, Georgia, USA: ATSDR; 2010.
57. Sutherland B, Strong P, King JC. Determining human dietary requirements for boron. *Biol Trace Elem Res* 1998;66:193–204.
58. Nielsen FH. Boron in human and animal nutrition. *Plant Soil* 1997;193:199–208.
59. Nielsen FH. Studies on the relationship between boron and magnesium which possibly affects the formation and maintenance of bones. *Magnes Trace Elem* 1990;9:61–69.
60. Iyengar GV, Clarke WB, Downing RG. Determination of boron and lithium in diverse biological matrices using neutron activation-mass spectrometry (NA-MS). *Fres J Anal Chem* 1990;338:562–566.
61. Nielsen FH. Update on human health effects of boron. *J Trace Elem Med Biol* 2014;28:383-387.

62. Hunt CD. Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology. *J Trace Elements in Med and Biol* 2012;26:157–160.
63. Hunt CD, Herbel JL, Idso JP. Dietary boron modifies the effects of vitamin D<sub>3</sub> nutrition on indices of energy substrate utilization and mineral metabolism in the chick. *J Bone Miner Res* 1994;9:171–181.
64. Wilson JH, Ruszler PL. Effects of dietary boron supplementation on laying hens. *Br Poul Sci* 1996;37:723–729.
65. Hegsted M, Keenan MJ, Siver F, Wozniak P. Effect of boron on vitamin D deficient rats. *Biol Trace Elem Res* 1991;28:243–256.
66. Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol* 2010 Oct;24(4):243-50.
67. Price CJ, Strong PL, Murray FJ, Goldberg MM. Blood boron concentration in pregnant rats fed boric acid throughout gestation. *Reprod Toxicol* 1997;11(6):833–842.
68. Scialli AR, Bondeb JP, Irene Brüske-Hohlfeldc B, Culverd D, Li Y, Sullivanf FM. An overview of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers. *Reprod Toxicol* 2010;29:10–24.
69. Duydu Y, Basaran N, Bolt HM. Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant. *J Trace Elem Med Biol* 2012;26(2–3):161–164.
70. Jaritz M. Barium. U: Elements and their Compounds in the Environment. 2nd Edition. Merian E, Anke M, Ihnhat M, Stoeppler M, ur. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004, str. 627-634.
71. Greenwood NN, Earnshaw A. *Chemie der Elemente*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft; 1988, str. 130-171.

72. Birch NJ, Padgham C. Barium. U: Seiler H, Sigel A, Sigel H, ur. Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. New York, NY, USA: Marcel Dekker; 1994, str. 255-258.
73. Malhi CS, Parshad VR, Ahmad N. Determination of potential of barium carbonate for the control of house rat *Rattus rattus*. *Z Angew Zool* 1994;80:43-49.
74. Gonçalves AM, Fernandes KG, Ramos LA, Cavalheiro ÉTG, Nóbrega JA. Determination and fractionation of barium in Brazil nuts. *J Braz Chem Soc* 2009;20(4):760-769.
75. Miller C. Trapping single ions inside single ions channels. *Biophys J* 1987;52:123-126.
76. Tankomiat W, Galassi W. Barium sulfate as contrast medium for evaluation of postoperative anastomotic leaks. *Acta Radiol* 2000;41(5):482-485.
77. Hluchan SE, Pomerantz K. Calcium and Calcium Alloys. U: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th completely revised edition, Vol. 6. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA; 2002, str. 41-44.
78. Bringhurst FR, Potts JT. Calcium and phosphate. U: DeGroot LJ, ur. *Endocrinology*. New York, NY, USA: Grune & Stratton; 1979, str. 551-585.
79. Broadus AE. Physiological functions of calcium, magnesium and phosphorus and mineral ion balance. U: Favus MJ, ur. *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism*. New York, NY, USA: Raven Press; 1993, str. 41-46
80. Peterlik M, Stoeppler M. Calcium. U: Merian E, Anke M, Ihnhat M, Stoeppler M, ur. *Elements and their Compounds in the Environment*. 2nd Ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004, str. 599-618.

81. Whedon GD. Recent advances in management of osteoporosis. U: Massry SG, Ritz E, Jahn H, ur. Phosphate and Mineral in Health and Disease. New York, NY, USA: Plenum Press; 1980m, str. 600-613.
82. Arnaud CD. Calcium homeostasis: regulatory elements and their integration. Fed Proc 1978;37:2557-2560.
83. Holick MF. Vitamin D. Biosynthesis, Metabolism, and Mode of Action. U: De Groot LJ, ur. Endocrinology. New York, NY, USA: Grune & Stratton; 1989, str. 902-926.
84. Jüppner H, Brown EM, Kronenberg HM. Parathyroid Hormone. U: Favus MJ, ur. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Philadelphia, PA, USA: Lipincott Williams & Wilkins; 1999, str. 88-91.
85. Cross HS, Klaushofer K, Peterlik M. Triiodthyronine and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: actions and interactions at the gene, cell and organ level. U: Bronner F, Peterlik M, ur. Extra and Intracellular Calcium and Phosphate Regulation. From Basic Science to Clinical Medicine. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1991.
86. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. Ann Intern Med 1990;112:352-364.
87. Eriksen EF. Estrogens and Bone. U: Heersche J, Kanis JA, ur. Bone and Mineral Research. Amsterdam, Nederlands: Elsevier; 1990, str. 273-312.
88. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. Rev Endocr Metab Disord 2010;11:219-227.
89. Alfadda TI, Saleh AM, Houillier P, Geibel JP. Calcium-sensing receptor 20 years later. Am J Physiol Cell Physiol 2014;307(3):C221-31.

90. Bronner F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J Cell Biochem* 2003;88(2):387-93.
91. Alexander RT, Rievaj J, Dimke H. Paracellular calcium transport across renal and intestinal epithelia. *Biochem Cell Biol* 2014;92(6):467-80.
92. Christakos S, Dhawan P, Porta A, Mady LJ, Seth T. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;347(1-2):25–29.
93. Bronner F. Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutrition Reviews* 2008;67(2):109-113.
94. Wasserman RH. Vitamin D and intestinal absorption of calcium: a view and overview. U: P JW, Feldman D, Glorieux F, editors. *Vitamin D*. San Diego, CA, USA: Academic press; 2005, str. 411–428.
95. Pak CY, Avioli LV. Factors affecting absorbability of calcium from calcium salts and food. *Calcif Tissue Int* 1988;43:55-60.
96. Heaney RP, Recker RR, Weaver CM. Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcif Tissue Int* 1990;46:300-304.
97. Bronner F. Renal calcium transport: mechanisms and regulation – an overview. *Am J Physiol* 1989;257:F707-711.
98. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.*, Washington, DC , USA: National Academy Press; 2010.
99. Johnson CC Jr, Miller JZ, Slemenda CW, Reister TK, Hui S, Christian JC, Peacock M. Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children. *N Engl J Med* 1992;327:82-87.

100. Matković V, Kostial K, Šimonović I, Buzina R, Brodarec A, Nordin BE. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 1979;32:540-549.
101. Daniels CE. Estrogen therapy for osteoporosis prevention in postmenopausal women. *Pharmacy Update-NIH* 2001;March/April
102. Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra A, Arnaud SB, DeLuca HF. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium. *J Clin Invest* 1979;64:729-736.
103. Fraser DR. Regulation of the metabolism of vitamin D. *Physiol Rev* 1980;60:551-613.
104. Peerenboom H, Keck E, Kruskemper HL, Strohmeyer G. The defect of intestinal calcium transport in hyperthyroidism and its response to therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:936-940.
105. Krawitt EL. Effect of ethanol ingestion on duodenal calcium transport. *J Lab Clin Med* 1975;85:665-671.
106. Jellin JM, Gregory P, Batz F, Hitchens K. Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter Natural Medicines Comprehensive Database. 3rd ed. Stockton, CA, USA: Therapeutic Research Facility; 2000.
107. National Osteoporosis Foundation. About Osteoporosis: Factors that Put You at Risk, 2011.
108. Leis HJ, Zach D, Huber E, Ziermann L, Gleispach H, Windischhofer W. Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing by the osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *Cell calcium* 1994;15:447-456
109. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kiofor O, Butiers RR Jr, Sugimoto T, Brown EM. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) express extracellular

- calcium (Ca<sup>2+</sup>)-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1998;13:1530-1538.
110. Dickinson HO, Nicolson DJ, Cook JV, Campbell F, Beyer FR, Ford GA, Mason J. Calcium supplementation for the management of primary hypertension in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(2):CD004639.
111. National Cancer Institute. Calcium and cancer prevention: Strengths and limits of the evidence. 2015. <http://www.cancer.gov/cancertopics/causes-prevention/risk-factors/diet/calcium-fact-sheet>
112. Kratz A, Sluss PM, Januzzi JL, Lewandowski KB. Appendix A: Reference values for laboratory tests. U: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, ur. *Harrison's principles of internal medicine*. 2005, A-1—A-9.
113. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Bone and mineral metabolism in health and disease. U: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, ur. *Harrison's principles of internal medicine*. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 2005, str. 2238-2249.
114. Vormann J. Magnesium. U: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M, ur. *Elements and their compounds in the environment*, 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004, str. 587-598.
115. Leroy J. Necessite du magnesium pour la croissance de la souris. *CR Seances de la Societe de Biologie* 1926;94:431-433.
116. Flink EB. Magnesium deficiency syndrome in man. *J Am Med Assoc* 1956;160:1406-1409.
117. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chem Acta* 2000;194:1-26.



118. Rude R.K. Magnesium. U: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, ur. Modern Nutrition in Health and Disease. 11th ed. Baltimore, MD, USA: Mass: Lippincott Williams & Wilkins; 2012, str. 159-75.
119. Volpe SL. Magnesium. U: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, ur. Present Knowledge in Nutrition. 10th ed. Ames, IA, USA: John Wiley & Sons; 2012, str. 459-74.
120. Elin RJ. Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. Magnes Res 2010;23:1-5.
121. Rude RK. Magnesium. U: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J, White JD, ur. Encyclopedia of Dietary Supplements. 2nd ed. New York, NY, USA: Informa Healthcare 2010:527-37.
122. Gibson, RS. Principles of Nutritional Assessment, 2nd ed. New York, NY, USA: Oxford University Press; 2005.
123. Witkowski M, Hubert J, Mazur A. Methods of assessment of magnesium status in humans: a systematic review. Magnesium Res 2011;24:163-80.
124. National Institutes of Health (NIH). Office of Dietary Supplements. Magnesium. 2015. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-HealthProfessional/#en6>
125. Dickinson HO, Nicolson D, Campbell F, Cook JV, Beyer FR, Ford GA, Mason J. Magnesium supplementation for the management of primary hypertension in adults. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006: CD004640.
126. Kass L, Weekes J, Carpenter L. Effect of magnesium supplementation on blood pressure: a meta-analysis. Eur J Clin Nutr 2012;66:411-8.
127. Del Gobbo LC, Imamura F, Wu JHY, Otto MCdO, Chiuve SE, Mozaffarian D. Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: a

- systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr* 2013;98:160-73.
128. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Dietary magnesium intake and risk of stroke: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr* 2012;95:362-6.
  129. Larsson SC, Wolk A. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Intern Med* 2007;262:208-14.
  130. Rodriguez-Moran M, Simental Mendia LE, Zambrano Galvan G, Guerrero-Romero F. The role of magnesium in type 2 diabetes: a brief based-clinical review. *Magnes Res* 2011;24:156-62.
  131. Simmons D, Joshi S, Shaw J. Hypomagnesaemia is associated with diabetes: not pre-diabetes, obesity or the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:261-6.
  132. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, Neumiller JJ, Nwankwo R, Verdi CL, Urbanski P, Yancy WS Jr. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care* 2013;36:3821-42.
  133. Rude RK, Singer FR, Gruber HE. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *J Am Coll Nutr* 2009;28:131–41.
  134. Tucker KL. Osteoporosis prevention and nutrition. *Curr Osteoporos Rep* 2009;7:111-7.
  135. Mutlu M, Argun M, Kilic E, Saraymen R, Yazar S. Magnesium, zinc and copper status in osteoporotic, osteopenic and normal post-menopausal women. *J Int Med Res* 2007;35:692-5.
  136. Musso C.G. Magnesium metabolism in health and disease. *Int Urol Nephrol* 2009;41:357-62.

137. Natural Medicines Comprehensive Database (NMCD). Magnesium. 2013.  
<http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/home.aspx?cs=&s=ND&AspxAutoDetectCookieSupport=1>
138. Chaudhary DP, Sharma R, Bansal DD. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: a review. *Biol Trace Elem Res* 2010;134:119–29.
139. Lu JF, Nightingale CH. Magnesium sulfate in eclampsia and pre-eclampsia: pharmacokinetic principles. *Clin Pharmacokinet*. 2000;38(4):305-14.
140. Royal Society of Chemistry. Phosphorus. 2016. <http://www.rsc.org/periodic-table/element/15/phosphorus>
141. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *Bonekey Rep* 2014;3:497.
142. Occupational Safety & Environmental Health (OSEH). Radiation Safety Service. University of Michigan. Phosphorus-32. 1998.  
<http://www.oseh.umich.edu/pdf/TrainP32.pdf>
143. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Phosphorus. In: *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. Washington, DC, USA: National Academies Press (US); 1997.
144. Aloia JF, Vaswani AN, Yeh JK, Ellis K, Cohn SH. Total body phosphorus in postmenopausal women. *Miner Electrolyte Metab* 1984;10:73–76.
145. Diem K. *Documenta Geigy*. Ardsley, NY, USA: Geigy Pharmaceuticals; 1970.
146. Penido MG, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr Nephrol* 2012;27:2039–2048.

147. Berndt T, Kumar R. Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol* 2007;69:341–359.
148. Amatschek S, Haller M, Oberbauer R. Renal phosphate handling in human-- what can we learn from hereditary hypophosphataemias? *Eur J Clin Invest* 2010;40:552–560.
149. Becker GJ, Walker RG, Hewitson TD, Pedagogos E. Phosphate levels-time for a rethink? *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2321–2324.
150. Jubiz W, Canterbury JM, Reiss E, Tyler FH. Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels. *J Clin Invest* 1972;51:2040–2046.
151. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001;81:239–297.
152. Burnett-Bowie SM, Henao MP, Dere ME, Lee H, Leder BZ. Effects of hPTH(1-34) infusion on circulating serum phosphate, 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 levels in healthy men. *J Bone Miner Res* 2009;24:1681–1685.
153. Xu H, Bai L, Collins JF, Ghishan FK. Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C487–C493.
154. Baxter LA, DeLuca HF. Stimulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1α-hydroxylase by phosphate depletion. *J Biol Chem* 1976;251:3158–3161.
155. George A, Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev* 2008;108:4670–4693.
156. Subramanian R, Khardori R. Severe hypophosphatemia. Pathophysiologic implications, clinical presentations, and treatment. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:1–8.

157. Exley C. Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality. *J Inorgan Biochem* 1998; 69:139–144.
158. Carlisle EM. Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *The Journal of Nutrition* 1991;121:201-207.
159. Schwarz K, Milne DB. Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature* 1972;239:333-334.
160. Jugdohsingh R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging* 2007;11(2):99-110.
161. Royal Society of Chemistry. Silicon. 2016. <http://www.rsc.org/periodic-table/element/14/silicon>
162. Klein, C. Rocks, minerals, and a dusty world. U: Guthrie, GD, Jr, Mossman, BT, ur. *Reviews in Mineralogy Vol. 28. Health effects of mineral dust*, Mineralogical Society of America. Washington, DC, USA: Bookcrafters Inc.; 1993. str. 8.
163. Anasuya A, Bapurao S, Paranjape PK. Fluoride and silicon intake in normal and endemic fluorotic areas. *J Trace Elem Med Biol* 1996; 10:149–155.
164. Jugdaohsingh R, Anderson SH, Tucker KL, Elliott H, Kiel DP, Thompson RPH, Powell JJ. Dietary silicon intake and absorption. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:887–893.
165. Pennington JAT. Silicon in foods and diets. *Food Addit Contam* 1991; 8:97–118.
166. Bellia JP, Birchall JD, Roberts NB. Beer: a dietary source of silicon. *The Lancet* 1994; 343:235.

167. Sangster AG, Hodson MJ. Silica in higher plants. U: Evered D, O'Connor M, ur. Silicon Biochemistry, Ciba Foundation Symposium 121. Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd.; 1986, str. 90-111.
168. Roberts NB, Williams P. Silicon measurement in serum and urine by direct current plasma emission spectrometry. Clin Chem 1990; 36:1460–1465.
169. Reffitt DM, Jugdoahsingh R, Thompson RPH, Powell JJ. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. J Inorgan Biochem 1999; 76:141–147.
170. Sripanyakorn S, Jugdoahsingh R, Elliott H, Walker C, Mehta P, Shoukru S, Thompson RP, Powell JJ. The silicon content of beer and its bioavailability in healthy volunteers. Br J Nutr 2004; 91:403–409.
171. D'Haese PC, Shaheen FA, Huraid SO, Djukanovic L, Polenakovic MH, Spasovski G, Shikole A, Schurgers ML, Daneels RF, Lamberts LV, Van Landeghem GF, De Broe ME. Increased silicon levels in dialysis patients due to high silicon content in the drinking water, inadequate water treatment procedures, and concentrate contamination: a multicentre study. Nephrology Dialysis Transplantation. 1995; 10:1838–1844.
172. Adler AJ, Berlyne GM. Silicon metabolism II. Renal handling in chronic renal failure patients. Nephron 1986; 44:36–39.
173. Roberts NB, Williams P. Silicon measurement in serum and urine by direct current plasma emission spectrometry. Clin Chem 1990; 36:1460–1465.
174. Berlyne G, Dudek E, Adler AJ, Rubin RE, Seidmen M. Silicon metabolism: the basic facts in renal failure. Kidney Int 1985; 28:S175–S177.
175. Carlisle EM. The nutritional essentiality of silicon. Nutr Rev 1982;40(7):193-8.

176. Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1973; 70:1608–1612.
177. Carlisle EM. Silicon: an essential element for the chick. *Science* 1972; 178:619.
178. Carlisle EM, Alpenfels WF. A silicon requirement for normal growth for cartilage in culture. *Federation Proceedings* 1980:39–787.
179. Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP, Powell JJ. Silicon intake is a major dietary determinant of bone mineral density in men and pre-menopausal women of the Framingham Offspring Cohort. *J Bone Mineral Res* 2004; 19:297–307.
180. Macdonald HM, Hardcastle AE, Jugdaohsingh R, Reid DM, Powell JJ. Dietary silicon intake is associated with bone mineral density in premenopausal women and postmenopausal women taking HRT. *J Bone Mineral Res* 2005; 20:S393.
181. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15(4):543–62.
182. Iler, RK. *The chemistry of silica: Solubility, polymerisation, colloid and surface properties, and biochemistry*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons; 1979.
183. Hall PW. Balkan endemic nephropathy: more questions than answers. *Nephron* 1992;62(1):1-5.
184. Seifert M. Strontium. U: Merian E, Anke M, Ihnhat M, Stoepler M, ur. *Elements and their Compounds in the Environment*. 2nd Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004, str. 619-626.

185. Lenihan JMA, Loutit JF, Martin JH. Strontium metabolism. London, UK: Academic Press; 1967.
186. Cabrera WE, Schrooten I, De Broe ME, D'Haese PC. Strontium and bone. *J Bone Miner Res* 1999;14:661-668.
187. Emsley J. The elements. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1992.
188. Mitchell RL. The trace element content of plants. London, UK: Research; 1957, str. 357-362.
189. Talmage SS, Watson BT. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev Environ Contam Toxicol* 1991;119:47-145.
190. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001;28:446-453.
191. Cohen-Solal M. Strontium overload and toxicity: impact on renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:30-34.
192. Reid IR, Pybus J, Lim TMT, Hannon S, Ibbertson HK. The assessment of intestinal calcium absorption using stable strontium. *Calcif Tissue Int* 1986;38:303-305.
193. Momčilović B, Duraković A, Kostial K. Influence of lactation on <sup>85</sup>Sr and <sup>47</sup>Ca <sup>241</sup> mobilization from the skeleton. *Arh Hig Rada Toksikol* 1971;22:235-243.
194. Schroeder HA, Tipton IH, Nason AP. Trace metals in man: strontium and barium. *J Chron Dis* 1972;25:491-517.
195. Schrooten I, Elseviers MM, Lamberts LV, De Broe ME, D'Haese PC. Increased serum strontium levels in dialysis patients: an epidemiological survey. *Kidney Int* 1999;56:1886-1892.



196. Mauras Y, Ang KS, Simon P, Tessier B, Cartier F, Allain P. Increase in blood plasma levels of boron and strontium in hemodialyzed patients. *Clin Chim Acta* 1986;156:315-320.
197. Rudolph H, Alfrey AC, Smythe WR. Muscle and serum trace element profile in uremia. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1973;19:456-465.
198. D'Haese PC, Couttenye MM, Lamberts LV, Elseviers MM, Goodman WG, Schrooten I, Cabrera WE, De Broe ME. Aluminum, iron, lead, cadmium, copper, zinc, chromium, magnesium, strontium, and calcium content in bone of end-stage renal failure patients. *Clin Chem* 1999;45(9):1548-56.
199. Morohashi T, Sano T, Yamada S. Effects of strontium on calcium metabolism in rats. I. A distinction between the pharmacological and toxic doses. *Jap J Pharmacol* 1994;64:155-162.
200. Peganova S, Eder K. Zinc. U: Merian E, Anke M, Ihnhat M, Stoeppler M, ur. *Elements and their Compounds in the Environment*. 2nd Ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004, str. 1203-1239.
201. Budavari S. *The Merck Index, an encyclopedia of chemicals and drugs*. Rahway, NJ, USA: Merck & Co. Inc; 1989, str. 1579-1598.
202. Weast RC. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 66th Ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Inc; 1986.
203. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 2006;20:3-18.
204. Wasteney ME, Aamodt RL, Rumble WF, Henkin RI. Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am J Physiol* 1986;251:R398-R408.
205. Jackson MJ. *Physiology of zinc: general aspects*. U: Mills SF, ed. *Zinc in Human Biology*. London, UK: Springer-Verlag; 1989, str. 1145-1174.

206. Contiero E, Folin M. Trace elements nutritional status. Use of hair as a diagnostic tool. *Biol Trace Elem Res* 1994;40(2):151-60.
207. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 221: Zinc. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
208. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. Zinc. 2015. <http://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>
209. Wood RJ, Zhang JJ. High dietary calcium intake reduce zinc absorption and balance in humans. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1803-1809.
210. Whittaker P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;68:442S-446S.
211. National Research Council (NRC). Subcommittee on Zinc., Baltimore, MD, USA: University Park Press; 1979.
212. Baer MT, King JC. Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. *Am J Clin Nutr* 1984;39:556-570.
213. Hambidge KM, Krebs NF. Zinc deficiency: a special challenge. *J Nutr* 2007;137:1101-5.
214. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab* 2007;51:301-23.
215. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc . Washington, DC, USA: National Academy Press; 2001.
216. Whitehead J. The design and analysis of sequential clinical trials. Chichester, UK: Ellis Horwood Limited: 1983.
217. Spilker B. Guide to Clinical Studies and Developing Protocols. New York, NY, USA: Raven Press; 1984.

218. Spilker B. Guide to Clinical Interpretation of Data. New York, NY, USA: Raven Press; 1986.
219. Spilker B. Guide to Planning and Managing Multiple Clinical Studies. New York, NY, USA: Raven Press; 1987.
220. Browne M. Charter of rights is adopted in UN. New York Times, August 05, 2009. <http://www.nytimes.com/learning/general/onthisday/big/0618.html>.
221. Oppenheim AN. Questionnaire design, interviewing and attitude measurement. London, UK: Continuum; 2004.
222. International Atomic Energy Agency (IAEA). Elemental analysis of biological materials. Vienna, Austria: IAEA-TEC DOC-197; 1980.
223. Burgess C. Valid analytical methods and procedures. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 2000.
224. Kaiser HF. A second generation little jiffy. Psychometrika 1970;35:401–415.
225. Field A. Discovering statistics using SPSS, 3rd ed., London, UK: Sage Publications Ltd; 2005.
226. Laerd statistics – Mann-Whitney U test, 2015; <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/mann-whitney-u-test-using-spss-statistics.php>
227. Momčilović B, Prejac J, Višnjević V, Mimica N, Morović S, Čelebić A, Drmić S, Skalny AV. „Environmental Human Silver Exposure“, Toxicological and Environmental Chemistry, Volume 94, Issue 6, July 2012, pages 1238-1246.
228. Evans JD. Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences. Pacific Grove, California, USA: Brooks/Cole Publishing; 1996.
229. Momčilović B, Prejac J, Momčilović R, Ivičić N, Veber D, Lykken GI. On the same element isotope mass number (pleiad) and the cluster of elements

- sharing the same mass numbers in the Periodic system—the Cheshuya (fish skin) model. *Trace Elem Med (Moscow)* 2008;9(3–4):5–20.
230. Kelly PJ, Twomey L, Sambrook PN, Eisman JA. Sex differences in peak adult bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 1990;5(11):1169-75.
231. Tsai KS, Pan WH, Hsu SH, Cheng WC, Chen CK, Chieng PU, Yang RS, Twu ST. Sexual differences in bone markers and bone mineral density of normal Chinese. *Calcif Tissue Int* 1996;59(6):454-60.
232. Boyd JC, Lacher DA. A multistage gaussian transformation algorithm for clinical laboratory data. *Clin Chem* 1982;28:1735-41.
233. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1964;26(2):211-252.
234. Elveback LR, Guiller CL Keating FR. Health, normality and the ghost of Gauss. *JAMA* 1970;211(1):69-75.
235. Razali N, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *J Stat Modeling Analitics* 2011;2(1):21–33.
236. Klevay LM. Hair as a biopsy material. Part I: Assessment of zinc nutriture. *Am J Clin Nutr* 1970;23(3):284-289.
237. Geigy Scientific Tables. Basel, Switzerland: Ciba-Geigy Limited; 1984.
238. Eckstein F, Matsuura M, Kuhn V, Priemel M, Müller R, Link TM, Lochmüller EM. Sex differences of human trabecular bone microstructure in aging are site-dependent. *J Bone Miner Res* 2007;22(6):817-24.
239. Fishbein L. Multiple sources of dietary calcium-some aspects of its essentiality. *Regul Toxicol Pharm.* 2004;39(2):67-80.
240. Pfeiffer C, Mailloux R. Excess copper as a factor in human diseases. *J Orthomol Med.* 1987;2/3:171-182.

241. Väänänen HK, Härkönen PL. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 1996;23 Suppl:S65-9.
242. Momčilović B, Prejac J, Višnjević V, Skalnaya M G, Mimica N, Drmić S, Skalny A V. Incommensurability of human hair and whole blood iodine. *Trace Elem Med (Moscow)*. 2012;13(1):20–24.
243. Jeruszka-Bielak M, Brzozowska A. Relationship between nutritional habits and hair calcium levels in young women. *Biol Trace Elem Res*. 2011;144:63-76.
244. Wang CT, Chang WT, Zeng WF, Lin CH. Concentrations of calcium, copper, iron, magnesium, potassium, sodium and zinc in adult female hair with different body mass indexes in Taiwan. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(4):389-93.
245. Selye H. *Calciphylaxis*. Chicago, IL, USA: The University of Chicago Press; 1962.
246. Lutsey PL, Alonso A, Michos ED, Loehr LR, Astor BC, Coresh J, Folsom AR. Serum magnesium, phosphorus, and calcium are associated with risk of incident heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 2014;100(3):756-64.
247. Prasad AS. Role of zinc in humans. In: Risby TH, ur. *Ultratrace metal analysis in biological sciences and environment*. Washington, DC, USA: American Chemical Society; 1979:197.
248. Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N. The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review. *Clin Rev Analyt Chem* 1994;24(5&6):363-398.

249. Laker M. On determining trace element levels in man: The uses of blood and hair. *The Lancet* 1982;31:260-263.
250. Momčilović B, Prejac J, Brundić S, Skalny AV, Mimica N, Drmić S. An essay on human and elements, multielement profiles, and depression. *Transl Neurosci* 2010;1:322-34.
251. Druyan ME, Bass D, Puchyr R, Urek K, Quig D, Harmon E, Marquardt W. Determination of reference ranges for elements in human scalp hair. *Biol Trace Elem Res* 1998;62:185-197.
252. Bass DA, Hickock D, Quig D, Urek K. Trace element analysis in hair: factors determining accuracy, precision, and reliability. *Altern Med Rev* 2001;6(5):472-81.
253. Esteban M, Castaño A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Enviro Int* 2009;35:438-449.
254. Rook A, Dawber R. *Diseases of hair and scalp*. Oxford, UK: Blackwell Sci Publ; 1982.
255. Gratzner W. *Giant molecules. From nylon to a nanotubes*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2009.
256. Robbins CR. *Chemical and physical behavior of human hair*. 5th ed. Berlin: Springer. 2012.
257. Foley KF. Urine Calcium: Laboratory Measurement and Clinical Utility. *Lab Med* 2010;41(11):683-686.
258. Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J* 2012;5(Suppl 1):i3-i14.
259. Momčilović B. On variability and dispersion of trace element analytical data results in the biological indicator tissue of hair – the power law disguised in

- the analytical error. 15th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA 15). Orlando, FL, USA: June 22-26; 2014.
260. Momčilović B, Prejac J, Višnjević V., Skalnaya M. G., Drmić S., Mimica N., Brundić S., Skalny A. V. Gender dependent differences in hair calcium, potassium, magnesium, sodium, phosphorus and zinc. 5th International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM 5). Avignon, France: 2013; May 22-24.
261. Momčilović B, Prejac J, Višnjević V, Skalnaya MG, Mimica N, Drmić S, Skalny AV. Hair iodine for human iodine status assessment. *Thyroid* 2014;2224:1018-1026.
262. Momčilović B, Prejac J, Višnjević V, Mimica N, Skalny AV. Hair as a novel long term biological indicator for assessing the human Na and K nutritional status. *Experimental Biology, Annual Meeting*. Boston, MA, USA: 2015; March 28-April 1.
263. Nacher JC, Akutsu T. Recent progress on the analysis of power-law features in complex cellular networks. *Cell Biochem Biophys* 2007;49:37-47.
264. Lingappa V. R., Farey K. *Physiological medicine – clinical approach to basic medical physiology*. New York, NY, USA: McGraw Hill; 2000.
265. Prejac J, Višnjević V, Drmić S, Skalny AA, Mimica N, Momčilović B. A novel concept to derive iodine status in human populations from frequency distribution properties of a hair iodine concentration. *J Trace Elem Med Biol* 2014;28:205-211.
266. Wolowiec P, Michalak I, Chojnacka K, Mikulewicz M. Hair analysis in health assessment. *Clin Chim Acta* 2013;419:139-171.
267. Alimonti A, Bocca B, Mannella E, Petrucci F, Zennaro F, Cotichini R, D'Ippolito C, Agresti A, Caimi S, Forte G. Assessment of reference values

- for selected elements in a healthy urban population. *Ann Ist Super Sanita* 2005;41(2):181-7.
268. Rodushkin I, Axelsson MD. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. *Sci Tot Environ* 2000;262(1-2):21-36.
269. Vitello DJ, Ripper RM, Fettiplace MR, Weinberg GL, Vitello JM. Blood Density Is Nearly Equal to Water Density: A Validation Study of the Gravimetric Method of Measuring Intraoperative Blood Loss. *J Vet Med* 2015; Article ID 152730: 4 pages.
270. Strain WH, Steadman LT, Lankau CA Jr. Analysis of zinc levels in hair for the diagnosis of zinc deficiency in man. *J Lab Clin Med* 1967;68:244-255.
271. Momčilović B, Ivičić N, Blanuša M, Šega K. Trace elements in the nails: A longitudinal study. U: Momčilović B, ur. *Trace Elements in Man and Animals 7 (TEMA 7)*. Zagreb, Croatia: Institute for Medical Research and Occupational Health, University of Zagreb: 1991;7:28.2-28.4.
272. Prasad AS. Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. *J Lab Clin Med* 1965;66:508.
273. Davies IJT, Musa M, Dormandy TL. Measurements of plasma zinc. *J Clin Pathol.* 1968;21:359.
274. Foley BS, Johnson A, Hackley B, Smith Jr JC, Halsted JA. Zinc content of human platelets. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1968;128:265.
275. Ozmen H, Akarsu S, Polat F, Cukurovli A. The levels of calcium, magnesium, and of selected trace elements, in whole blood and scalp hair of children with growth retardation. *Iran J Pediatr* 2013;23(2):125-130.



276. Castillo-Durán C, Cassorla F. Trace minerals in human growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12(5):589-601.
277. Reinhold JG, Kfoury GA, Ghalamabor MA, Bennet JC. Zinc and copper concentrations in hair of Iranian villagers. *Am J Clin Nutr* 1966;18:294-300.
278. Iyengar V, Woittiez J. Trace elements in human clinical specimens: Evaluation of literature data to identify reference ranges. *Clin Chem* 1988;34(3):474-481.
279. Rodushkin I, Ödman F, Branth S. Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 1999;364:338-346.
280. Rodushkin I, Ödman F, Olofsson R, Burman E, Axelsson MD. Multi-element analysis of body fluids by double-focusing ICP-MS. *Transworld Res Network Recent Res Devel Pure & Applied Chem* 2001;5:51-66.
281. Dermience M, Lognay G, Mathieu F, Goyens P. Effects of thirty elements on bone metabolism. *J Trace Elem Med Biol* 2015 Oct;32:86-106.
282. Huttunen MM, Tillman I, Viljakainen HT, Tuukkanen J, Peng Z, Pekkinen M, Lamberg-Allardt CJ. High dietary phosphate intake reduces bone strength in the growing rat skeleton. *J Bone Miner Res* 2007;22(1):83-92.
283. Kemi VE, Kärkkäinen MU, Lamberg-Allardt CJ. High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *Br J Nutr* 2006;96(3):545-52.
284. Fenton TR, Lyon AW, Eliasziw M, Tough SC, Hanley DA. Phosphate decreases urine calcium and increases calcium balance: a meta-analysis of the osteoporosis acid-ash diet hypothesis. *Nutr J* 2009;15;8:41.
285. Karp HJ, Vaihia KP, Kärkkäinen MU, Niemistö MJ, Lamberg-Allardt CJ. Acute effects of different phosphorus sources on calcium and bone

- metabolism in young women: a whole-foods approach. *Calcif Tissue Int* 2007 Apr;80(4):251-8.
286. Višnjević V, Prejac J, Skalny AA, Momčilović B. Median concentrations of phosphorus in human hair do not differ between Croatia, Macedonia, Japan, and the United States. X ISTERH Conference. Trace Element Research on Health and Diseases. Tokyo, Japan: 2013; November 18-22, P-33.
287. Linder MC. Nutrition and metabolism of the major minerals. U: Linder MC, ur. Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications. New York, NY, USA: Elsevier; 1985, str. 133-149.
288. Nielsen FH, Poellot R. Dietary silicon affects bone turnover directly in ovariectomized and sham-operated growing rats. *J Trace Elem Exp Med* 2004;17:137-149.
289. Seaborn C, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res* 2002;89:251-261.
290. Seaborn C, Nielsen FH. Effects of germanium and silicon on bone mineralization. *Biol Trace Elem Res* 1994;42:151-164.
291. Lugowski SJ, Smith DC, Bonek H, Lugowski J, Peters W, Semple J. Analysis of silicon in human tissues with special reference to silicone breast implants. *J Trace Elem Med Biol* 2000;14(1):31-42.
292. Cianferotti L, D'Asta F, Brandi ML. A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013;5(3):127–139.
293. Reginster JY, Kaufman JM, Goemaere S, Devogelaer JP, Benhamou CL, Felsenberg D, Diaz-Curiel M, Brandi ML, Badurski J, Wark J, Balogh A, Bruyère O, Roux C. Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with

- strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2012 Mar;23(3):1115-22.
294. Skoryna SC. Effects of oral supplementation with stable strontium. *Can Med Assoc J* 1981;125:703-712.
295. Amersham. *Metastron in prostatic cancer*. Aylesbury Buckinghamshire, UK: Amersham Intl.; 1989.
296. Vezzoli G, Baragetti I, Zerbi S, Caumo A, Soldati L, Bellinzoni P, Centemero A, Rubinacci A, Moro G, Bianchi G. Strontium absorption and excretion in normocalciuric subjects: relation to calcium metabolism. *Clin Chem* 1998;44(3):586-90.
297. Goullé J-P, Mahieu L, Casternmant J, Neveau N, Bonneau L, Laine G, Bouige D, Lacroix C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int* 2005;153:39-44.
298. Hunt CD. Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron. *Journal of Trace Elem Exp Med* 1996;9:185-213.
299. Naghii MR, Torkaman G, Mofid M. Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats. *Biofactors* 2006;28(3-4):195-201.
300. Newnham RE. Essentiality of boron for healthy bones and joints. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 7:83-5.
301. Nielsen FH. Micronutrients in parenteral nutrition: boron, silicon, and fluoride. *Gastroenterology* 2009;137(5 Suppl):S55-60.
302. Smylevich L, Dougherty ER. *Probabilistic Boolean network*. Philadelphia, PA, USA: Society for industrial and Applied Mathematics; 2012.

303. Science Notes. Table of Valences of the Elements.

<https://sciencenotes.org/valences-of-the-elements/>

## 11 APENDIKS

Apendiks 1. Kosa. Deskriptivna (opisna) statistika.

KOSA		Medijan ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\bar{x}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	SE ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Skewness	Kurtosis
B	♂+♀	1,095	1,838	1,793	0,133	2,16	5,26
	♂	1,623	1,865	2,229	0,205	1,24	0,83
	♀	0,860	1,754	1,461	0,168	3,22	12,10
Ba	♂+♀	0,668	2,706	1,286	0,195	9,89	116,15
	♂	0,523	0,522	0,655	0,057	2,81	11,91
	♀	0,960	3,493	1,766	0,335	7,77	70,09
Ca	♂+♀	1202,5	1649,7	1791,7	119,1	1,68	3,44
	♂	592,0	748,3	851,5	82,1	21,12	90,33
	♀	2038,0	1786,4	2507,6	171,1	1,19	2,03
Mg	♂+♀	104,3	198,98	183,07	14,36	2,62	9,48
	♂	56,9	87,63	90,33	9,62	3,48	166,87
	♀	192,0	229,23	253,69	21,96	2,12	6,31
P	♂+♀	147,3	63,24	161,14	4,56	5,02	35,36
	♂	155,2	64,12	166,87	7,04	43,08	2,67
	♀	141,0	62,50	156,79	5,99	4,62	31,16
Si	♂+♀	28,86	55,96	44,28	4,04	5,23	40,18
	♂	21,87	24,29	28,19	2,67	2,49	1,65
	♀	34,49	68,87	56,46	6,60	4,44	27,50
Sr	♂+♀	2,006	4,144	3,339	0,299	3,89	20,74
	♂	1,156	1,442	1,652	0,158	1,92	5,04
	♀	3,490	4,994	4,623	0,478	3,22	13,44
Zn	♂+♀	186,90	166,12	210,12	11,99	9,58	112,50
	♂	193,80	58,37	195,71	6,41	1,02	3,49
	♀	184,00	214,32	221,09	20,53	7,79	70,77

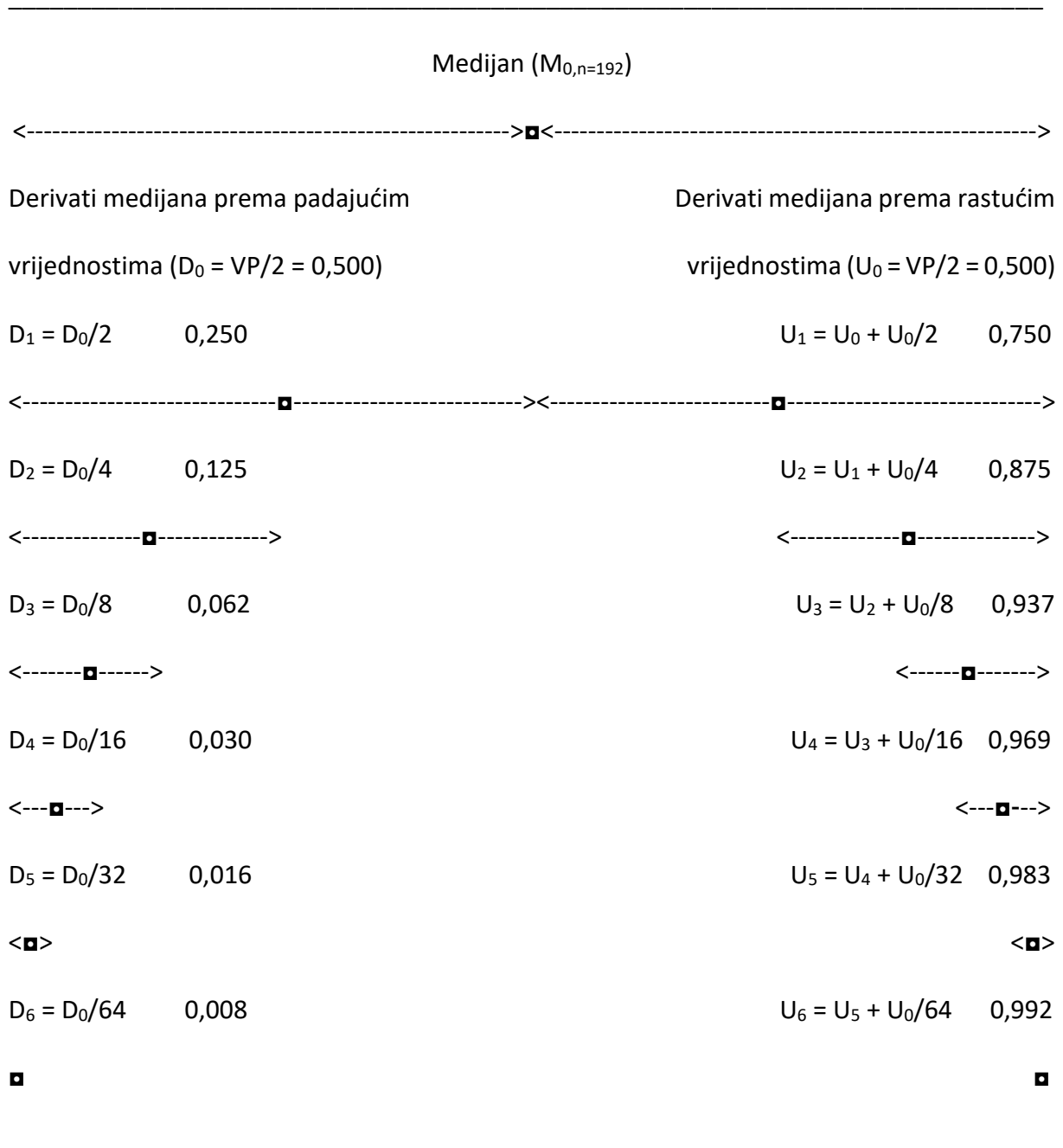
SD = standardna devijacija;  $\bar{x}$  = aritmetička sredina; SE = Standardna pogreška; ♂+♀ = svi ispitanici ( $n_{\text{♂+♀}}=192$ ); ♂ = muškarci ( $n_{\text{♂}}=83$ ); ♀ = žene ( $n_{\text{♀}}=109$ ).

Apendiks 2. Krv. Deskriptivna (opisna) statistika.

KRV		Medijan ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\bar{x}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	SE ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Skewness	Kurtosis
B	♂+♀	0,0393	0,2054	0,0960	0,0182	4,09	16,96
	♂	0,0523	0,2514	0,1287	0,0339	3,24	10,26
	♀	0,0358	0,1560	0,0713	0,0187	31,41	0,03
Ba	♂+♀	0,0342	0,1312	0,0423	0,0116	10,60	117,03
	♂	0,0406	0,1966	0,0619	0,0265	7,25	53,30
	♀	0,0238	0,0290	0,0275	0,0034	2,56	10,66
Ca	♂+♀	61,152	16,369	61,071	1,447	-1,25	4,61
	♂	59,930	16,839	59,908	2,271	-1,16	5,18
	♀	62,300	16,066	61,948	1,880	-1,36	4,61
Mg	♂+♀	31,460	5,292	32,402	0,468	0,27	2,27
	♂	31,350	5,985	32,911	0,807	0,17	2,40
	♀	31,510	4,711	32,020	0,551	0,29	1,69
P	♂+♀	372,0	88,24	371,26	7,80	8,46	2,73
	♂	386,0	87,44	369,81	11,79	-2,62	10,91
	♀	366,4	89,43	372,36	10,47	-1,49	7,41
Si	♂+♀	1,235	4,337	2,732	0,383	2,50	0,02
	♂	1,740	5,384	4,007	0,726	1,79	2,28
	♀	0,980	3,043	1,772	0,356	3,50	12,21
Sr	♂+♀	0,0148	0,0164	0,0167	0,0015	7,36	60,54
	♂	0,0137	0,0243	0,0189	0,0033	5,19	28,09
	♀	0,0142	0,0052	0,0151	0,0006	1,22	2,09
Zn	♂+♀	5,987	1,097	6,064	0,097	1,13	4,48
	♂	6,530	1,210	6,538	0,163	1,28	4,73
	♀	5,700	0,852	5,706	0,100	0,20	1,06

SD = standardna devijacija;  $\bar{x}$  = aritmetička sredina; SE = Standardna pogreška; ♂+♀ = svi ispitanici ( $n_{\text{♂+♀}}=158$ ); ♂ = muškarci ( $n_{\text{♂}}=70$ ); ♀ = žene ( $n_{\text{♀}}=88$ ).

Apendiks 3. Model za derivate medijana elemenata u kosi i krvi (Veličina populacije, VP = 1,000)



U ovoj disertaciji proučavana je distribucija frekvencija medijana i derivata medijana od 8 ispitivanih bioelemenata u kosi i krvi za procjenu statusa tih elemenata u organizmu. Prvo se izračun vrijednost medijana ( $M_0$ ) koncentracija ispitivane populacije. Po definiciji, pola populacije nalazi se iznad medijana (grana derivata

prema rastućim vrijednostima,  $U_0$ ), dok se druga polovica nalazi ispod medijana (grana derivata prema padajućim vrijednostima,  $D_0$ ). Dakle, veličina populacije (VP) za  $M_0$  je suma obje grane oko središnje točke  $M_0$ , tj.,  $PS = U_0 + D_0 = 0,5 + 0,5 = 1,0$ . Kako rastuće, tako i padajuće vrijednosti mogu se dalje podijeliti na isti način računajući „medijan od medijana“ u seriju sljedova derivata medijana ( $U_{0,1,2,3 \dots n-1, n}$  i  $D_{0,1,2,3 \dots n-1, n}$ ). Za svaki derivat medijana populacije, stvarna koncentracija ispitivanog elementa se može odrediti. Tako se, umjesto mehaničke implementacije unaprijed stvorene percentilne rešetke na dobivene podatke, dobiva krivulja derivata medijana iz samog skupa podataka <sup>302</sup>.



Apendiks 4. Koncentracije derivata medijana za svih 8 elemenata u kosi i punoj krvi (MDC), za muškarce (D1-D6 silazni MDC, U1-U6 uzlazni MDC) i za žene (d1-d6 silazni MDC, u1-u6 uzlazni MDC)( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Apendiks 4a. Kalcij (Ca).

KOSA											
Zajednički medijan ( $M_0$ ) <sub>n192</sub> = 1202,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ca											
♂ Medijan ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 592,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ca						♀ Medijan ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 2038,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ca					
MDC	n	Ca	MDC	n	Ca	MDC	n	Ca	MDC	n	Ca
D1	42	414,6	U1	42	1124,5	d1	55	1100,0	u1	55	3479,0
D2	21	345,1	U2	21	1424,1	d2	28	716,2	u2	28	4632,5
D3	11	279,2	U3	11	1837,0	d3	14	474,5	u3	14	5541,5
D4	6	269,0	U4	6	2091,0	d4	7	380,2	u4	7	5914,2
D5	3	260,3	U5	3	2724,6	d5	4	322,9	u5	4	6796,5
D6	2	243,9	U6	2	4215,3	d6	2	283,9	u6	2	8588,5

KRV											
Zajednički medijan ( $M_0$ ) <sub>n158</sub> = 61,15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ca											
♂ Medijan ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 59,93 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ca						♀ Medijan ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 62,30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ca					
MDC	n	Ca	MDC	n	Ca	MDC	n	Ca	MDC	n	Ca
D1	35	53,94	U1	35	66,27	d1	44	53,56	u1	44	72,60
D2	18	50,60	U2	18	77,20	d2	22	48,45	u2	22	77,78
D3	9	38,78	U3	9	81,51	d3	11	43,37	u3	11	79,91
D4	5	18,11	U4	5	85,39	d4	6	37,90	u4	6	85,99
D5	3	0,00	U5	3	96,83	d5	3	0,00	u5	3	86,52
D6	2	0,00	U6	2	105,45	d6	2	0,00	u6	2	92,73

Apendiks 4b. Cink (Zn).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 186,90  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Zn

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 193,80 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 184,00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn					
MDC	n	Zn	MDC	n	Zn	MDC	n	Zn	MDC	n	Zn
D1	42	164,4	U1	42	222,8	d1	55	156,4	u1	55	226,4
D2	21	127,0	U2	21	256,8	d2	28	131,6	u2	28	264,6
D3	11	117,1	U3	11	280,4	d3	14	102,5	u3	14	340,3
D4	6	99,3	U4	6	294,1	d4	7	97,2	u4	7	422,4
D5	3	94,6	U5	3	336,4	d5	4	76,2	u5	4	700,5
D6	2	85,2	U6	2	393,1	d6	2	52,8	u6	2	1468,0

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 5,99  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Zn

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n80</sub> = 6,53 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 5,70 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Zn					
MDC	n	Zn	MDC	n	Zn	MDC	n	Zn	MDC	n	Zn
D1	35	5,90	U1	35	7,00	d1	44	5,20	u1	44	6,13
D2	18	5,49	U2	18	7,60	d2	22	4,89	u2	22	6,54
D3	9	5,04	U3	9	8,16	d3	11	4,51	u3	11	6,87
D4	5	4,56	U4	5	9,00	d4	6	4,12	u4	6	7,50
D5	3	4,09	U5	3	10,60	d5	3	3,63	u5	3	7,62
D6	2	3,78	U6	2	11,44	d6	2	3,61	u6	2	8,00

Apendiks 4c. Fosfor (P).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 147,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{P}$

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 155,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{P}$						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 141,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{P}$					
MDC	n	P	MDC	n	P	MDC	n	P	MDC	n	P
D1	42	136,6	U1	42	184,3	d1	55	128,6	u1	55	167,2
D2	21	121,0	U2	21	205,4	d2	28	115,7	u2	28	197,7
D3	11	116,1	U3	11	221,9	d3	14	106,2	u3	14	234,1
D4	6	110,9	U4	6	232,3	d4	7	103,0	u4	7	275,8
D5	3	104,1	U5	3	263,4	d5	4	98,0	u5	4	320,4
D6	2	104,1	U6	2	461,8	d6	2	86,0	u6	2	493,4

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 372,8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{P}$

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 386,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{P}$						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 366,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{P}$					
MDC	n	P	MDC	n	P	MDC	n	P	MDC	n	P
D1	35	347,7	U1	35	405,0	d1	44	337,0	u1	44	413,9
D2	18	332,0	U2	18	418,0	d2	22	316,0	u2	22	452,0
D3	9	291,5	U3	9	446,0	d3	11	300,2	u3	11	491,0
D4	5	126,5	U4	5	475,0	d4	6	259,1	u4	6	512,0
D5	3	0,0	U5	3	537,5	d5	3	0,0	u5	3	555,0
D6	2	0,0	U6	2	572,0	d6	2	0,0	u6	2	582,5

Apendiks 4d. Magnezij (Mg).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 104,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Mg

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 56,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Mg						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 192,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Mg					
MDC	n	Mg	MDC	n	Mg	MDC	n	Mg	MDC	n	Mg
D1	42	45,1	U1	42	103,4	d1	55	91,7	u1	55	313,9
D2	21	35,6	U2	21	149,1	d2	28	68,7	u2	28	505,9
D3	11	31,7	U3	11	197,0	d3	14	48,5	u3	14	664,8
D4	6	29,8	U4	6	301,0	d4	7	36,8	u4	7	827,0
D5	3	27,3	U5	3	485,0	d5	4	25,7	u5	4	928,6
D6	2	26,4	U6	2	521,1	d6	2	24,0	u6	2	1194,8

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 31,46  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Mg

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 31,35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Mg						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 31,51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Mg					
MDC	n	Mg	MDC	n	Mg	MDC	n	Mg	MDC	n	Mg
D1	35	29,41	U1	35	36,57	d1	44	29,43	u1	44	34,40
D2	18	27,72	U2	18	38,78	d2	22	27,78	u2	22	37,21
D3	9	26,85	U3	9	41,40	d3	11	25,63	u3	11	39,47
D4	5	25,66	U4	5	47,61	d4	6	24,75	u4	6	43,24
D5	3	18,83	U5	3	48,11	d5	3	23,94	u5	3	43,58
D6	2	12,69	U6	2	48,30	d6	2	20,46	u6	2	44,80

Apendiks 4e. Silicij (Si).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 28,86  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Si

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 21,87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Si						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 34,49 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Si					
MDC	n	Si	MDC	n	Si	MDC	n	Si	MDC	n	Si
D <sub>1</sub>	42	13,73	U <sub>1</sub>	42	34,97	d <sub>1</sub>	55	22,27	u <sub>1</sub>	55	65,09
D <sub>2</sub>	21	10,47	U <sub>2</sub>	21	47,27	d <sub>2</sub>	28	16,62	u <sub>2</sub>	28	106,65
D <sub>3</sub>	11	3,75	U <sub>3</sub>	11	61,70	d <sub>3</sub>	14	11,99	u <sub>3</sub>	14	136,20
D <sub>4</sub>	6	3,27	U <sub>4</sub>	6	93,65	d <sub>4</sub>	7	4,78	u <sub>4</sub>	7	203,96
D <sub>5</sub>	3	0,60	U <sub>5</sub>	3	116,20	d <sub>5</sub>	4	0,85	u <sub>5</sub>	4	262,00
D <sub>6</sub>	2	0,30	U <sub>6</sub>	2	131,28	d <sub>6</sub>	2	0,30	u <sub>6</sub>	2	414,10

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 1,235  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Si

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 1,740 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Si						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 0,980 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Si					
MDC	n	Si	MDC	n	Si	MDC	n	Si	MDC	n	Si
D <sub>1</sub>	35	0,708	U <sub>1</sub>	35	3,975	d <sub>1</sub>	44	0,360	u <sub>1</sub>	44	1,640
D <sub>2</sub>	18	0,383	U <sub>2</sub>	18	11,967	d <sub>2</sub>	22	0,000	u <sub>2</sub>	22	2,820
D <sub>3</sub>	9	0,000	U <sub>3</sub>	9	15,505	d <sub>3</sub>	11	0,000	u <sub>3</sub>	11	3,733
D <sub>4</sub>	5	0,000	U <sub>4</sub>	5	17,721	d <sub>4</sub>	6	0,000	u <sub>4</sub>	6	12,880
D <sub>5</sub>	3	0,000	U <sub>5</sub>	3	20,174	d <sub>5</sub>	3	0,000	u <sub>5</sub>	3	12,931
D <sub>6</sub>	2	0,000	U <sub>6</sub>	2	21,740	d <sub>6</sub>	2	0,000	u <sub>6</sub>	2	14,495

Apendiks 4f. Stroncij (Sr).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 2,006  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Sr

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 1,156 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Sr						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 3,490 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Sr					
MDC	n	Sr	MDC	n	Sr	MDC	n	Sr	MDC	n	Sr
D1	42	0,627	U1	42	2,175	d1	55	1,640	u1	55	5,820
D2	21	0,433	U2	21	3,315	d2	28	1,093	u2	28	7,411
D3	11	0,370	U3	11	4,040	d3	14	0,599	u3	14	11,825
D4	6	0,352	U4	6	4,611	d4	7	0,420	u4	7	18,510
D5	3	0,350	U5	3	6,223	d5	4	0,365	u5	4	24,565
D6	2	0,288	U6	2	7,233	d6	2	0,405	u6	2	30,500

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 0,0138  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Sr

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 0,0137 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Sr						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 0,0142 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Sr					
MDC	n	Sr	MDC	n	Sr	MDC	n	Sr	MDC	n	Sr
D1	35	0,0110	U1	35	0,0179	d1	44	0,0115	u1	44	0,0179
D2	18	0,0096	U2	18	0,0213	d2	22	0,0099	u2	22	0,0199
D3	9	0,0090	U3	9	0,0248	d3	11	0,0088	u3	11	0,0224
D4	5	0,0083	U4	5	0,0682	d4	6	0,0081	u4	6	0,0281
D5	3	0,0080	U5	3	0,1375	d5	3	0,0079	u5	3	0,0311
D6	2	0,0078	U6	2	0,1649	d6	2	0,0074	u6	2	0,0321

Apendiks 4g. Bor (B).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 1,095  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  B

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 56,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ B						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 192,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ B					
MDC	n	B	MDC	n	B	MDC	n	B	MDC	n	B
D1	42	0,830	U1	42	3,119	d1	55	0,532	u1	55	1,543
D2	21	0,578	U2	21	4,766	d2	28	0,434	u2	28	2,570
D3	11	0,386	U3	11	6,007	d3	14	0,330	u3	14	4,057
D4	6	0,260	U4	6	6,405	d4	7	0,271	u4	7	6,320
D5	3	0,119	U5	3	7,190	d5	4	0,161	u5	4	8,420
D6	2	0,069	U6	2	7,615	d6	2	0,059	u6	2	9,898

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 0,0393  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  B

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 0,0523 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ B						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 0,0358 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ B					
MDC	n	B	MDC	n	B	MDC	n	B	MDC	n	B
D1	35	53,94	U1	35	66,27	d1	44	53,56	u1	44	72,60
D2	18	50,60	U2	18	77,20	d2	22	48,45	u2	22	77,78
D3	9	38,78	U3	9	81,51	d3	11	43,37	u3	11	79,91
D4	5	18,11	U4	5	85,39	d4	6	37,90	u4	6	85,99
D5	3	0,00	U5	3	96,83	d5	3	0,00	u5	3	86,52
D6	2	0,00	U6	2	105,45	d6	2	0,00	u6	2	92,73

Apendiks 4h. Barij (Ba).

KOSA

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n192</sub> = 0,668  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Ba

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n83</sub> = 0,523 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ba						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n109</sub> = 0,960 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ba					
MDC	n	Ba	MDC	n	Ba	MDC	n	Ba	MDC	n	Ba
D1	42	0,330	U1	42	0,773	d1	55	0,500	u1	55	2,050
D2	21	0,263	U2	21	1,193	d2	28	0,340	u2	28	2,536
D3	11	0,200	U3	11	1,378	d3	14	0,238	u3	14	4,264
D4	6	0,155	U4	6	1,535	d4	7	0,227	u4	7	4,810
D5	3	0,139	U5	3	2,361	d5	4	0,158	u5	4	9,172
D6	2	0,135	U6	2	2,969	d6	2	0,136	u6	2	22,958

KRV

Zajednički medijan ( $M_0$ )<sub>n158</sub> = 0,0341  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Ba

♂ Median ( $M_0$ ) <sub>n70</sub> = 0,0406 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ba						♀ Median ( $M_0$ ) <sub>n88</sub> = 0,0238 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ba					
MDC	n	Ba	MDC	n	Ba	MDC	n	Ba	MDC	n	Ba
D1	35	0,0050	U1	35	0,0536	d1	44	0,0050	u1	44	0,0435
D2	18	0,0021	U2	18	0,0620	d2	22	0,0019	u2	22	0,0460
D3	9	0,0013	U3	9	0,0730	d3	11	0,0015	u3	11	0,0585
D4	5	0,0012	U4	5	0,0789	d4	6	0,0013	u4	6	0,0784
D5	3	0,0009	U5	3	0,7815	d5	3	0,0013	u5	3	0,1246
D6	2	0,0007	U6	2	1,4827	d6	2	0,0011	u6	2	0,1523



Apendiks 5. Valencije elemenata. Najčešće valencije su podcrtane <sup>303</sup>.

Element	Valencija
B	<u>3</u> , 2, 1
Ba	<u>2</u>
Ca	<u>2</u>
Mg	<u>2</u>
P	<u>5</u> , 4, <u>3</u> , 2, 1, 0, -1, -2, <u>-3</u>
Si	<u>4</u> , 3, 2, 1, -1, -2, -4
Sr	<u>2</u>
Zn	<u>2</u> , 1, 0

Juraj Prejac rođen je 31. ožujka 1981. u Zagrebu gdje je završio osnovnu i srednju školu (V. gimnaziju). Od 1999.g. studirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirao 2005.g. Po obavljenom pripravničkom stažu u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb, 2007.g. položio je stručni ispit i stekao odobrenje za samostalan rad. Od 2007. do 2011.g. obavio je specijalizaciju iz interne medicine, a od 2012. do 2014.g. užu specijalizaciju iz internističke onkologije u KBC Zagreb. Godine 2017. završio je poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravlje“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Zaposlen je u Klinici za onkologiju KBC-a Zagreb u Zavodu za tumore probavnih organa. Ujedno je i vanjski suradnik na Katedri za patofiziologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Član je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za internističku onkologiju, Hrvatskog društva za aterosklerozu, Hrvatske udruge za Alzheimerovu bolest i Hrvatske Mense.

Od Hrvatske akademije medicinskih znanosti dodijeljena mu je nagrada „Borislav Nakić“ za najbolji znanstveni rad objavljen u 2014.g. od autora mlađeg od 35 godina. Suradivao je na znanstvenom projektu „Metali - biokompatibilnost i stres u alopeciji, depresiji i dijabetesu“ te dvije kliničke studije u KBC-u Zagreb.

Do sada je objavio 11 znanstvenih članaka indeksiranih u *Current Contents*, 7 u *Science Citation Index Expanded* te 14 članaka indeksiranih u drugim znanstvenim bazama. Održao je dva predavanja na međunarodnim znanstvenim simpozijima u inozemstvu uz 46 međunarodnih kongresnih priopćenja od čega je 12 objavljeno u znanstvenim časopisima. Redoviti je recenzent u *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.