

**Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet**



Jovana D. Jagodić

**Metalomika benignih oboljenja  
nadbubrežne žlezde**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

**University of Belgrade – Faculty of Chemistry**



Jovana D. Jagodić

**Metallomics of benign adrenal gland diseases**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

## **Mentori**

---

Dr Dragan Manojlović, redovni profesor Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

---

Dr Aleksandar Stojsavljević, viši naučni saradnik, Inovacioni centar Hemijskog fakulteta u Beogradu

## **Članovi komisije**

---

Dr Dušanka Milojković Opsenica, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

---

Dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

---

Dr Zoran Gluvić, docent, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Na ovom mestu želim da izrazim svoju najiskreniju i najdublju zahvalnost svima koji su doprineli nastanku ovog doktorata. Bez vas, ovo putovanje ne bi bilo moguće, a vaše prisustvo, podrška i verovanje u mene učinili su ga neprocenjivim.*

*Prvo, iz sveg srca želim da se zahvalim svojim mentorima, prof. dr Draganu Manojloviću i dr Aleksandru Stojsavljeviću. Prof. Manojlović mi je pružio priliku i podršku da zakoračim u svet nauke, na čemu sam mu neizmerno zahvalna. Zahvalna sam Vam što ste mi omogućili da budem deo Vašeg istraživačkog tima i da kroz Vašu podršku gradim sebe kao naučnika. Dr Stojsavljeviću, hvala Vam na nesebičom deljenju znanja i saveta, što ste sa neverovatnom strpljivošću, prijateljstvom i posvećenošću oblikovali moj naučni put i ulagali svoje vreme u moj razvoj. Vaša stručnost i zalaganje ostavili su neizbrisiv trag na ovom radu i na mom ličnom i profesionalnom razvoju. Neizmerno sam Vam zahvalna što ste bili sve vreme uz mene na ovom putu kako u lepim tako i u izazovnim trenucima.*

*Veliku zahvalnost dugujem i članovima komisije, prof. dr Dušanki Milojković-Opsenici, prof. dr Mariji Gavović-Jankulović i dr Zoranu Gluviću, čije su stručne sugestije, povratne informacije, i konstruktivni komentari značajno doprineli kvalitetu ovog rada. Vaša podrška, stručnost i uvidi bili su od neprocenjivog značaja za unapređenje ovog doktorata.*

*Zahvalnost dugujem i svojim kolegama iz laboratorija 538 i 537, pre svega Simketu i Igoru, kao i Slavki i Banetu. Hvala vam što ste delili svoja iskustva i neizmernu energiju, ali i što ste bili tu za sve one male trenutke podrške i zajedničkog smeha.*

*Zahvaljujem se i dr Branislavu Rovčaninu na savetima i obezbeđenim uzorcima humanog biološkog materijala za potrebe izrade ove disertacije.*

*Naravno, ova zahvalnica ne bi bila potpuna bez moje porodice. Moji roditelji, Dragomir i Svetlana, predstavljaju temelj moje snage. Hvala vam na ljubavi, strpljenju i podršci koju mi pružate od samog početka, kroz ceo moj život. Vaša vera u mene i beskrajna ljubav bili su snaga koja me je gurala napred i u najtežim trenucima. Vaš trud, požrtvovanost i nesebičnost pokazali su mi šta znači biti posvećen i verovati u snove i da ih je uz dovoljno truda moguće dostići.*

*Mojoj sestri Tijani, hvala ti neizmerno što si uz mene uvek, bez obrira na sve. Bez tebe ne bih mogla da zamislim svoj život. Hvala ti za sve razgovore, smeh, oslonac i ljubav – tvoje prisustvo i nesebična podrška čine moj život potpunim. Tvoj osmeh, humor i reči ohrabrenja uvek su mi donosili mir. Hvala ti što uvek umeš da me nasmeješ i oraspoložiš. Bez tebe, Tijana, ovo putovanje ne bi bilo isto.*

*Posebno se zahvaljujem svom dečku Branku, čiji su ljubav, razumevanje i nepokolebljiva podrška bili moj oslonac tokom celog ovog puta. Hvala ti što si mi pružao snagu da nastavim i veru da mogu uspeti. Branko, hvala ti što si bio uz mene u svim fazama ovog puta, delio sa mnom i izazove i uspehe, i što si me podsećao na ono što je zaista važno. Hvala ti što si uvek verovao u mene, čak i kada sam ja sumnjala, i što si bio moje utočište i sigurnost.*

*Moja najbolja drugarica Teodora zauzima posebno mesto u ovoj zahvalnici. Hvala ti što si uvek uz mene, pružajući mi oslonac i snagu da izdržim svaki izazov. Tvoja energija, vedrina i prijateljstvo učinili su ovaj put neprocenjivo vrednim. Tvoj humor i podrška učinili su sve izazove podnošljivijim i svaki trenutak lepšim. Hvala ti što idemo zajedno kroz život.*

*Na kraju, hvala svima koji su na bilo koji način doprineli ovom radu, bilo podrškom, inspiracijom, lepim rečima ili pružanjem prilika.*

## LISTA SKRAĆENICA

AA – adrenalni adenomi  
ICP – induktivno spregnuta plazma  
OES – optička emisijska spektroskopija  
MS – masena spektrometrija  
ICP-MS – induktivno spregnuta plazma masena spektrometrija  
ICP-OES – induktivno kuplovana plazma optička emisijska spektroskopija  
DHEA – dehidroepiandrosteron  
DHEA-S – dehidroepiandrosteron-sulfat  
StAR – steroidogeni akutni regulatorni protein  
CYP11A1 – holesterol-desmolaza  
CBG – globulin koji vezuje kortikosteroid  
OGF – opioidni faktor rasta  
JG ćelije – jukstaglomerularne ćelije  
ACE – angiotenzin konvertujući enzim  
HPA osovina – osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda  
CRH – kortikotropin oslobađajući hormon  
ACTH – adrenokortikotropni hormon  
ENSAT – European Network for the Study of Adrenal Tumors  
ACC – adrenokortikalni karcinom  
MnSOD – mangan-superoksid-dismutaza  
CuZnSOD – bakar,cink-superoksid-dismutaza  
GIT – gastrointestinalni trakt  
IARC – International Agency for Research on Cancer  
BEC – pozadinska ekvivalentna koncentracija  
RF – radiofrekventni  
KED – koliziono-reakciona ćelija  
R – izlaznost (engl. recovery)  
SRM – sertifikovani referentni materijal  
RSD – relativna standardna devijacija  
AAT – adrenalno adenomatozno tkivo  
ZAT – zdravo adrenalno tkivo  
EDC – endokrino ometajuće supstance  
FDA – Uprava za hranu i lekove (Food and Drug Administration)  
GPx – glutation-peroksidaza  
PCC – feohromocitoma  
ATP – adenzin-trifosfat  
CST – Kušingov sindrom-uzorkujuće solidno tkivo

## Metalomika benignih oboljenja nadbubrežne žlezde

### SAŽETAK

Ova disertacija je imala za cilj da pruži uvid u koncentracije ključnih mikro- (Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb, U) i makroelemenata (Na, K, Mg, Ca) u uzorcima zdravog tkiva nadbubrega i uzoraka patološki izmenjenih tkiva osoba sa dijagnostikovanim adrenalnim adenomima i feohromocitomima. Rezultati analize adrenalnih tkiva upotpunjeni su analizom uzoraka pune krvi, u cilju detaljnijeg uvida u status ispitivanih elemenata.

Uzorci zdravog adrenalnog tkiva (ZAT) imali su manje Cu, Mn, Se, Zn, K, Mg i više Pb u odnosu na adenomatozno adrenalno tkivo (AAT), dok su suprotni rezultati dobijeni analizom pune krvi. U odnosu na uzorke tkiva feohromocitoma (eng. pheochromocytoma, PCC), u ZAT su uočene manje koncentracije Zn, Se, Na, K i Mg i veće Mn, Co, Pb i As. Kontrolna krv imala je veće koncentracije Mn, Cu, Zn, Se i Mg i manje Na, K i Ca u odnosu na krv PCC pacijenata.

U uzorcima ZAT uočene su veće koncentracije Ni, Na i K i manje Zn, Se, Cd, Th i Mg u odnosu na uzorke tkiva obolelih od Kušingovog sindroma (eng. Cushing's syndrome tissue – CST). Krv kontrolne grupe imala je manje koncentracije Mn, Ni, As i K, kao i viši Co, Cu, Se, Pb, Na i Ca u odnosu na uzorke pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma.

U poređnom analizom uzoraka zdravih i patološki izmenjenih tkiva uočava se veća zastupljenost Se, Zn, K i manja Ni i Mg u svim patološki izmenjenim adrenalnim tkivima: AAT, PCC i CST. Takođe, Cu, Se, Ni, As, K, Ca i Na istakli su se u razdvajanju kontrolnih uzoraka krvi od pacijenata svih ispitivanih patoloških stanja.

Prikazani rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu ispitivanih elemenata u patofiziološkim procesima nadbubrega. Utvrđene promene u koncentracijama elemenata mogle bi da pomognu u rasvetljavanju patogeneze ispitivanih nadbubrežnih oboljenja i daju značaj budućim istraživanjima metalomike nadbubrežnih žlezda.

**Ključne reči:** Nadbubrežna žlezda; Mikro- i makroelementi; ICP; Adrenalna tkiva; Puna krv; Metalomika.

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Analitička hemija

## Metallomics of benign adrenal gland diseases

### ABSTRACT

This dissertation aimed to provide insight into the concentrations of key micro- (Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb, U) and macro-elements (Na, K, Mg, Ca) in healthy adrenal tissue samples and samples of pathologically changed tissues of persons diagnosed with adrenal adenomas and pheochromocytomas. The results of the analysis of adrenal tissues were completed with the analysis of whole blood samples, in order to gain a more detailed insight into the status of the examined elements.

Healthy adrenal tissue (HAT) samples had less Cu, Mn, Se, Zn, K, Mg and more Pb compared to adenomatous adrenal tissue (AAT), while the opposite results were obtained by whole blood analysis. In relation to pheochromocytoma tissue samples (eng. pheochromocytoma, PCC), lower concentrations of Zn, Se, Na, K and Mg and higher concentrations of Mn, Co, Pb and As were observed in ZAT. Control blood had higher concentrations of Mn, Cu, Zn, Se, and Mg and less Na, K, and Ca compared to the blood of PCC patients.

Higher concentrations of Ni, Na, and K and lower concentrations of Zn, Se, Cd, Th, and Mg were observed in ZAT samples compared to Cushing's syndrome tissue (CST) samples. Control blood had lower concentrations of Mn, Ni, As and K, as well as higher Co, Cu, Se, Pb, Na and Ca compared to patient samples.

A comparative analysis of samples of healthy and pathologically altered tissues shows a higher prevalence of Se, Zn, K and lower Ni and Mg in all pathologically altered adrenal tissues: AAT, PCC and CST. Also, Cu, Se, Ni, As, K, Ca and Na stood out in the separation of control blood samples from patients with all investigated pathologies.

The presented results indicate the potential role of the examined elements in the pathophysiological processes of the adrenal gland. Determined changes in the concentrations of elements could help in elucidating the pathogenesis of the examined adrenal diseases and give importance to future studies of metallomics of the adrenal glands.

**Keywords:** Adrenal gland; Microelements; Macroelements; ICP; Tissue samples; Blood samples

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Analytical chemistry

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	9
2. OPŠTI DEO.....	12
2.1. Anatomija i fiziologija nadbubrežne žlezde.....	12
2.2. Hormoni nadbubrežne žlezde.....	14
2.3. Renin-angiotenzin-aldosteron sprega (RAAS).....	19
2.4. Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda.....	21
2.5. Benigni tumori nadbubrežne žlezde.....	22
2.5.1. Adrenalni adenomi.....	22
2.5.2. Kušingov sindrom.....	22
2.5.3. Konov sindrom.....	23
2.5.4. Addisonova bolest (adrenalna insuficijencija).....	24
2.6. Benigno oboljenje sa izraženim malignim potencijalom.....	25
2.6.1. Feohromocitom.....	25
2.7. Maligni tumori nadbubrežne žlezde.....	26
2.7.1. Adrenokortikalni karcinom.....	27
2.8. Esencijalni mikroelementi.....	27
2.9. Toksični mikroelementi.....	31
2.10. Makroelementi.....	35
2.11. Metalomika.....	39
2.12. Analitičke tehnike zasnovane na induktivno spregnutoj plazmi.....	40
2.12.1. Priprema uzoraka za analizu.....	40
2.12.2. Način uvođenja uzorka i princip obrazovanja induktivno kuplovane plazme.....	41
2.12.3. Kalibracija.....	45
2.12.4. Interna standardizacija.....	45
2.12.5. Metoda standardnog dodatka i razblaživanje izotopa.....	45
2.12.6. Interferencije.....	45
2.12.7. Uklanjanje smetnji.....	46
2.12.8. ICP-OES.....	47
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	49
3.1. Sakupljanje uzoraka solidnih tkiva i pune krvi.....	49
3.2. Hemikalije i instrumenti.....	49
3.3. Priprema kliničkih uzoraka mikrotalasnom digestijom.....	55
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	56
4.1. Adrenalni adenomi.....	56
4.1.1. Adrenalni tkivni materijal.....	56
4.1.2. Puna krv.....	68
4.2. Feohromocitomi.....	80
4.2.1. Adrenalni tkivni materijal.....	80
4.2.2. Puna krv.....	87
4.3. Kušingov sindrom.....	96
4.3.1. Adrenalni tkivni materijal.....	96
4.3.2. Puna krv.....	100
4.4. Komparativna analiza ispitivanih patoloških stanja nadbubrežne žlezde.....	106
4.4.1. Esencijalni mikroelementi.....	106
4.4.2. Toksični mikroelementi.....	108
4.4.3. Makroelementi.....	109
5. ZAKLJUČAK.....	111
6. LITERATURA.....	112
7. BIBLIOGRAFIJA.....	126
8. BIOGRAFIJA.....	127



## 1. UVOD

Nadbubrežne (adrenalne) žlezde su mali, parni organi mase 3 - 7 g, prosečne veličine 50 × 20 mm (Val i Martinez 2016; Hall i Guyton 2011). Predstavljaju deo endokrinog sistema i pozicionirane su iznad bubrega (Val i Martinez 2016; Megha i sar. 2022). Desna nadbubrežna žlezda je piramidalnog oblika i nalazi se veoma blizu donje šuplje vene (Slika 1). Leva nadbubrežna žlezda ima polumesečast oblik i nalazi se u blizini slezinske arterije (Megha i sar. 2022, Jarolim i sar. 2003).

Fiziološke uloge nadbubrežnih žlezda su raznovrsne i uključuju regulaciju energetskog metabolizma, reakcije na stres, regulaciju imunskog sistema, homeostazu telesnih tečnosti i elektrolita (Hall i Guyton 2011). Nadbubrežne žlezde se sastoje iz dve morfološki i funkcionalno različite celine - kore (korteksa) i srži (medule) - koje igraju ključnu ulogu u lučenju različitih hormona (Auchus 2014). Korteks luči glukokortikoide, mineralokortikoide i androgene, dok medula luči kateholamine. Nadbubrezi su bogato vaskularizovani organi, jer se snabdeavaju krvlju od strane nadbubrežne i bubrežne arterije, kao i putem nekoliko pomoćnih arterija koje se odводе od aorte (Yiallouris i sar. 2019; Betts i sar. 2013).

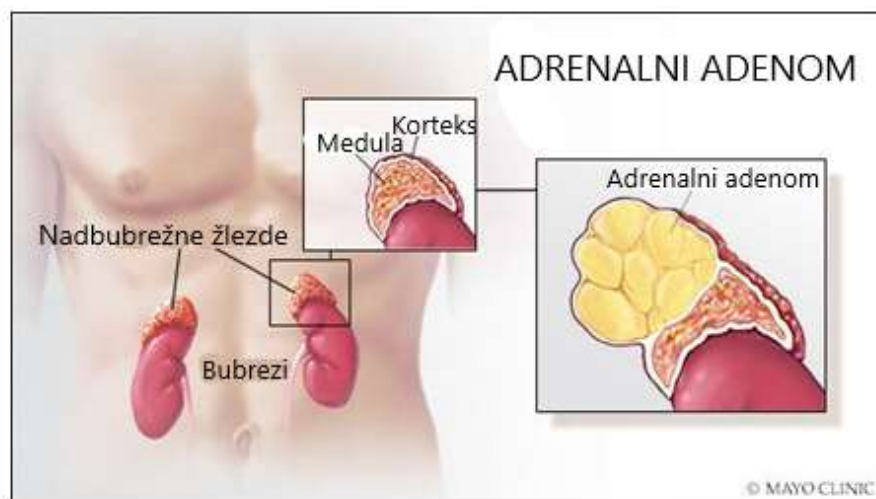


Slika 1. Topografska anatomija nadbubrega

Izvor: <https://www.upstate.edu/whatsup/2016/0322-restoring-peace-why-salvaging-the-adrenal-gland-makes-sense.php>

Dobra prokrvljenost i sposobnost da akumuliraju toksične supstance čini nadbubrege podložnim organima za ispoljavanje efekata endokrinog prekida (Lotfi i sar. 2018), koji podrazumeva negativan uticaj različitih supstanci na metabolizam, sintezu i transport hormona (Guarnotta i sar. 2022). S obzirom na to da endokrini sistem obavlja brojne uloge u regulaciji metaboličkih procesa, izlaganje toksičnim supstancama usko je povezano sa promenama u normalnom funkcionisanju endokrinog sistema, uključujući i funkcionisanje nadbubrežnih žlezda (Liu i sar. 2023; Laurretta i sar. 2019).

Najnoviji literaturni podaci ukazuju na značaj mikroelemenata u održavanju homeostaze endokrinog sistema, jer njihova previsoka ili preniska koncentracija može dovesti do izmenjenog funkcionisanja nadbubrega i nastanka poremećaja/oboljenja. Uzimajući u obzir štetne efekte toksičnih supstanci, među kojima su posebno značajni toksični mikroelementi, od velike je važnosti da se identifikuju upravo oni mikroelementi koji dovode do nadbubrežne disfunkcije. Osim štetnih efekata toksičnih mikroelemenata, bitno je istaći i uticaj esencijalnih mikroelemenata kao i makroelemenata u održavanju adekvatne funkcije nadbubrežnih žlezda (Laurretta i sar. 2019, Stojavljević i sar. 2019).



Slika 2. Adrenalni adenom

Izvor: <https://newsnetwork.mayoclinic.org/discussion/mayo-clinic-q-and-a-understanding-adrenal-adenoma/>

Tumori nadbubrega u najvećem broju slučajeva imaju benignu prirodu. Međutim, benigni tumori nadbubrega većih prečnika mogu imati maligni potencijal (Chatzellis i sar. i Kaltsas 2019). Epidemiološke i kliničke studije su pokazale da se benigne nadbubrežne mase učestalije dijagnostikuju kod žena nego kod muškaraca (Mahmood i Anastasopoulou 2020). Obdukcioni izveštaji ukazuju da se benigne nadbubrežne mase javljaju kod približno 5% ljudi preko 50 godina i da njihova učestalost raste sa godinama (Michalidou i Guerrero 2017; Wang i sar. 2018).

Adenomi nadbubrežne žlezde (adrenalni adenomi - AA) su benigne neoplazme korteksa žlezde (Slika 2). Njihova učestalost je u značajnom porastu širom sveta (Salem i sar. 2019). Obdukcione studije su pokazale da je učestalost AA oko 3% (Salem i sar. 2019; Singh i Buch 2008). Adrenalni adenomi su u najvećem broju slučajeva afunkcionalni tumori, jer ne luče hormone, ali mogu imati funkcionalni (sekretorni) potencijal. Stoga, AA su pretežno asimptomatski tumori i obično se dijagnostikuju slučajno (incidentalomi) (Salem i sar. 2019).

Napredak u razvoju analitičkih tehnika iznedrio je pouzdaniju, tačniju i precizniju kvantifikaciju makro- i mikroelemenata u različitim uzorcima, uključujući i kliničke uzorke (Sajnog i sar. 2019; Guede i sar. 2017). Od posebnog značaja su tehnike zasnovane na induktivno spregnutoj plazmi (ICP) sa optičkom emisionom spektroskopijom (OES) ili masenom spektrometrijom (MS) (Havia i sar. 2016; Han i sar. 2013; Dessie i sar. 2020). Tehnike, poput ICP-MS i ICP-OES, su veoma pouzdane u elementalnoj analizi, jer pružaju tačne i precizne informacije o koncentraciji ispitivanog elementa ili elemenata u kliničkom uzorku (Guede i sar. 2017, Havia i sar. 2016; Han i sar. 2013). Neke od prednosti ICP tehnika, u odnosu na atomsku apsorpcionu spektrofotometriju, obuhvataju veoma nisku granicu detekcije (ICP-MS), veliki linearni dinamički opseg (ICP-OES i ICP-MS) i mogućnost kvantifikacije većeg broja elemenata (ICP-OES i ICP-MS) (Dessie i sar. 2020; Harrington i sar. 2014; Topdagı i sar. 2020; Toker i sar. 2019; Chen i sar. 2020).

Nezavisno od značajnog razvoja analitičkih tehnika za određivanje makro- i mikroelemenata, od ključnog značaja u elementalnoj analizi je pravilan izbor kliničkog uzorka. Tako tečni klinički uzorci najčešće pružaju informacije o kratkotrajnoj izloženosti elementima ili o njihovom nedavnom unosu putem vazduha, hrane ili pijaće vode (Burtis i sar. 2012). Nasuprot tečnim kliničkim uzorcima, analiziranjem elemenata u punoj krvi dobijaju se informacije o dužoj izloženosti organizma elementima, usled njegove akumulacije u eritrocitima, čiji je životni vek oko 120 dana (Burtis i sar. 2012).

Najdugoročniji uvid u elementalni status dobija se analiziranjem solidnih tkiva (adrenalnih, tiroidnih, moždanih i dr.), zbog čega su ovi klinički materijali od primarnog značaja u metalomici (Burtis i sar. 2012). Međutim, analiza uzoraka pune krvi i solidnih tkiva, za razliku od tečnih kliničkih uzoraka, predstavlja veći analitički izazov zbog složenijeg matriksa. Metoda izbora za pripremu uzoraka pune krvi i solidnih tkiva je kiselo-potpomognuta mikrotalasna digestija (Theiner i sar. 2018; Grassin-Delye i sar. 2019). Tehnika izbora za kvantifikaciju makroelemenata i određenih mikroelemenata je ICP-OES, dok je ICP-MS tehnika izbora za kvantifikaciju mikroelemenata, posebno onih u ultra-tragovima (Balcaen i sar. 2014).

Elementalni profil nadbubrežne žlezde za sada nije razjašnjen, s obzirom na to da su uzorci adrenalnih tkiva dostupni isključivo neposredno nakon hirurške ili obdukcione procedure. Stoga, ova studija imala je za cilj da:

1) pruži prvi i sveobuhvatni uvid u profil esencijalnih i toksičnih mikroelemenata i makroelemenata zdravih/kontrolnih tkiva nadbubrežne žlezde;

2) sagleda i uporedi koncentracije mikro- i makroelemenata u nadbubrežnim tkivima pacijenata sa patohistološki dijagnostikovanim benignim oboljenjima (adenomima, feohromocitomima ili Kušingovim sindromom) sa zdravim/kontrolnim tkivom;

3) sagleda status i izvrši uporednu analizu toksičnih i esencijalnih mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima pune krvi zdravih volontera i pacijenata koji boluju od benignih oboljenja nadbubrega (adenoma, Kušingovog sindroma ili feohromocitoma).

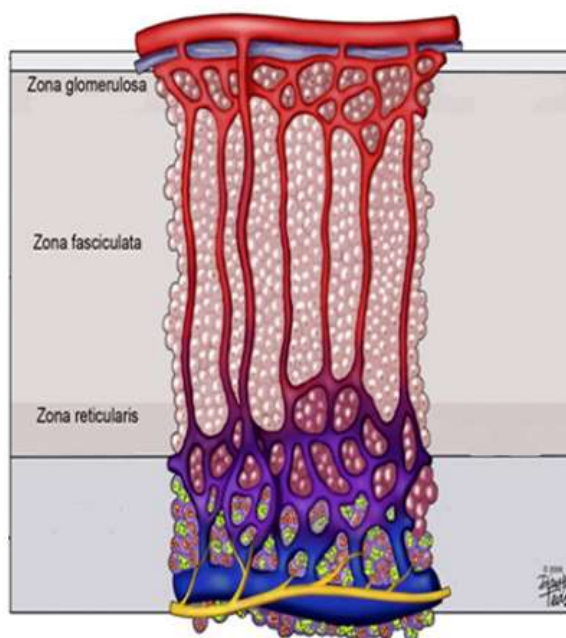
Zadati ciljevi upotpunjeni su praćenjem uticaja relevantnih demografskih i kliničko-patoloških parametara na koncentracije ispitivanih elemenata, prvenstveno pola, godina života, konzumiranja duvana i veličine tumorske promene (mase). Kako se patogeneza humanog oboljenja jedino može rastumačiti na nivou ciljnog tkiva koje se analizira, krajnji cilj ove studije bio je da istakne esencijalne i/ili toksične elemente koji bi mogli a imati uticaj na patogenezu ispitivanih oboljenja nadbubrežne žlezde.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Anatomija i fiziologija nadbubrežne žlezde

Nadbubrežne (adrenalne/suprarenalne) žlezde su parni organi malih dimenzija i mase. Zahvaljujući brojnim, malim arterijama koje se granaju od lumbalnog dela aorte ili od bubrežnih arterija, nadbubrezi su bogato prokrvljeni organi (Goodman 2009). Sastoje se iz dve odvojene celine koje su različite po funkciji i poreklu, korteksa (kore) i medule (srži), gde medula čini svega 10% ukupne mase nadbubrega. Medula vodi poreklo od ćelija nervnog grebena koje potiču od dorzalne aorte, dok korteks potiče od mezoderma (Xing i sar. 2015). Nadbubrežne žlezde se razvijaju prenatalno, oko 28. dana od začeća (Dutt i sar. 2023).

Korteks nadbubrežne žlezde se sastoji iz tri morfološki različita sloja: *zone glomeruloze*, *zone fascikulate* i *zone retikularis* (Slika 3), gde svaka zona luči različite hormone, usled postojanja specifičnih enzima/proteina u svakoj zoni (Nussey i Whitehead, 2001; Betts i sar. 2013). Zabeleženo je postojanje i četvrtog sloja, *fetalne zone*, koja je prisutna tokom razvoja embriona/ fetusa kao i tokom prve godine života deteta. *Fetalna zona*, zajedno sa placentom, učestvuje u proizvodnji estrogena tokom perioda trudnoće (Dutt i sar. 2023; Petroff i Greco, 2020). Sve ćelije od kojih je sačinjen korteks nadbubrega imaju jedinstvenu strukturu sekretujućih ćelija, visok sadržaj lipida, glatki endoplazmatični retikulum i prisustvo mitohondrija (Petroff i Greco, 2020). *Zona glomeruloza* luči mineralokortikoide, *zona fascikulata* luči glukokortikoide, dok *zona retikularis* proizvodi prekursore androgena (Dutt i sar. 2023; Nussey i Whitehead, 2001). Interesantno je napomenuti da *zona glomeruloza* i *zona fascikulata* tokom života ostaju iste veličine i pri istom kapacitetu proizvodnje steroidnih hormona, što nije slučaj sa *zonom retikularis*. Nasuprot, *zona retikularis* se razvija i raste do 30. godine života, nakon čega se postepeno smanjuje (involuira) (Auchus 2014).

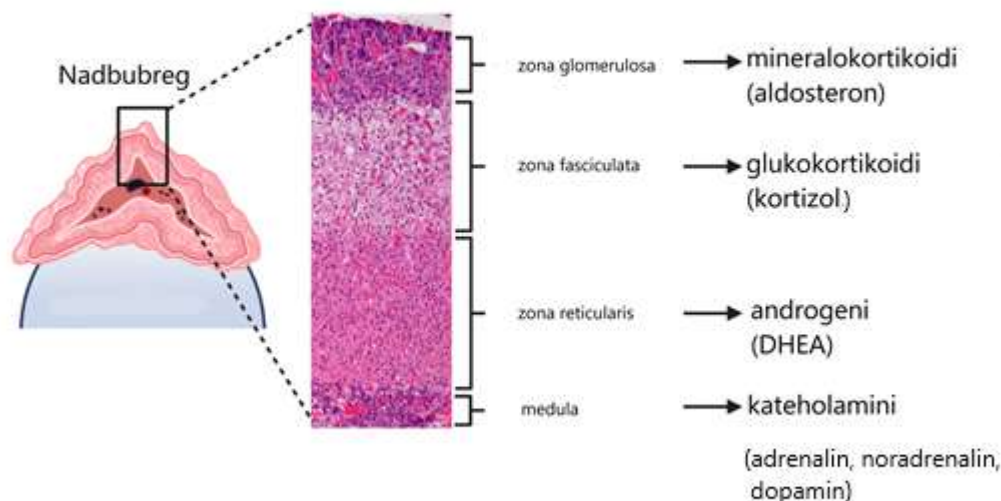


Slika 3. Morfo-funkcionalne zone kore nadbubrežne žlezde

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278929/>

Ćelije koje čine *zonu glomerulozu* grupisane su u klastere (glomerule) i imaju ulogu u lučenju hormona aldosterona. Aldosteron utiče na distalne tubule i sabirne kanaliće u nefronu bubrega, što za posledicu ima aktivnu reapsorpciju jona natrijuma i

izlučivanje jona kalijuma. Održavanjem gradijenta ovih jona, aldosteron reguliše krvni pritisak i održava adekvatnu zapreminu krvi. Gubitak *zone glomeruloze* ili nemogućnost lučenja aldosterona može dovesti do smrtnog ishoda, usled zadržavanja velikih koncentracija jona kalijuma i velikih gubitaka jona natrijuma, hlorida i vode (Hall i Guyton 2011; Goodman 2009; Yiallouris et al, 2019;).



Slika 4. Korteks i medula nadbubrega  
Izvor <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/7/1245>

*Zone fasciculata* i *retikularis* su funkcionalno odvojene od zone glomeruloze. U *zoni fascikulati*, koja čini najveći udeo korteksa žlezde (70%), redovi ćelija su orijentisani u paralelne trake (*fasce*) (Slika 4). *Zona fasciculata* luči glukokortikoide, među kojima je kortizol najzastupljeniji. Unutrašnji deo korteksa sastoji se od guste mreže ćelija, koja se naziva *zona retikularis* (Slika 4). Ona ima ulogu u lučenju androgena, dehidroepiandosterona (DHEA) i DHEA-sulfata (DHEA-S), koji su prekursori testosterona (Goodman 2009; Jason i Oltmann, 2019).

Za biosintezu kortikosteroida neophodan je holesterol, koji se skladišti kao holesteril-acetat. Transport holesterola u ćeliji od spoljašnje ka unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani regulisan je od strane steroidogenog akutnog regulatornog proteina (engl. steroidogenic acute regulatory protein - StAR). Prevođenje holesterola u pregnenolon se odigrava preko CYP11A1 (holesterol-desmolaza). CYP11A1 je eksprimiran u sva tri sloja korteksa nadbubrežne žlezde i ima ulogu u katalizovanju koraka koji ograničava brzinu proizvodnje steroidnih hormona. Dalji proces prevođenja pregnenolona isključivo zavisi od specifičnih enzima unutar zona korteksa nadbubrega (Rosol i sar. 2001; Dutt i sar. 2023).

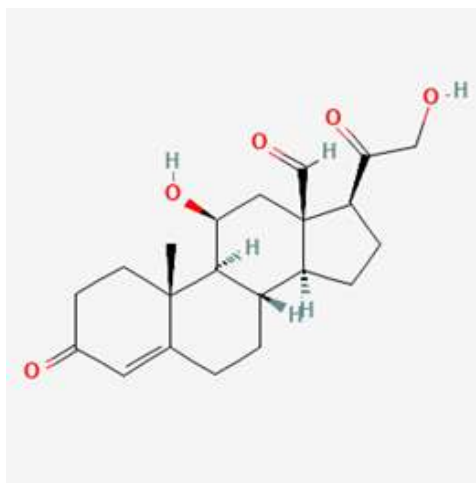
Medula nadbubrežne žlezde, pored feohromoblasta, sadrži i presinaptične simpatičke ganglijske ćelije (hromafinske (hromafine) ćelije), što čini medulu nadbubrega delom simpatičkog nervnog sistema. Medula nadbubrega ima ulogu u proizvodnji različitih supstanci, uključujući kateholamine, metanefrine (metaboliti kateholamina), met-enkefalin, supstancu P, neurotenzin i hromogranin A. Od kateholamina, medularne ćelije proizvode dopamin, noradrenalin (norepinefrin) i adrenalin (epinefrin) (Jason i Oltmann, 2019).

Nadbubrežni hormoni izlučuju se u sistemsku cirkulaciju nadbubrežnim venama. Sekrecija hormona odigrava se neposredno po njihovoj sintezi, kako zbog lipidne rastvorljivosti, tako i zbog nedostatka aktivnih skladišta u kortikalnim ćelijama. Hormoni kore nadbubrežne žlezde se vezuju za proteine plazme, prvenstveno za transkortin ili globulin koji vezuje kortikosteroide (engl. corticosteroid-binding globulin - CBG), a u nešto manjoj meri za albumine. Glikoprotein jetre CBG ima oko 20 puta veći afinitet ka kortizolu u odnosu na aldosteron. Oko 95% kortizola i oko 60% aldosterona je u krvotoku vezano za proteine plazme. Koncentracija slobodnog (nevezanog) kortizola je u plazmi oko 100 puta veća od koncentracije aldosterona. Hormoni nadbubrežne žlezde imaju relativno dug poluživot u krvotoku - oko dva sata za kortizol i oko 15 minuta za aldosteron, što se može objasniti vezivanjem za proteine plazme, koji im, pored produžavanja poluživota, povećavaju i rastvorljivost u krvotoku. Nevezani hormoni su funkcionalno aktivni, te mogu da intereaguju sa ciljnim ćelijama ili da se prevedu u neaktivne oblike (Goodman i sar. 2009; Rosol i sar. 2001).

## 2.2. Hormoni nadbubrežne žlezde

### *Aldosteron*

Biosinteza aldosterona se odigrava u *zoni glomerulozi* korteksa nadbubrežne žlezde. Na biosintezu aldosterona u fiziološkim uslovima utiču različiti faktori, poput aktivacije renin-angiotenzin sistema, povišeni nivoi jona kalijuma i lučenje adrenokortikotropina (ACTH) (Ferreira i sar. 2021). Aldosteron-sintaza, 21-hidroksilaza, 11- $\beta$ -hidroksilaza su tri enzima koja su odgovorna za lučenje aldosterona, dok pad aktivnosti ovih enzima dovodi do neadekvatne sinteze ovog hormona. Nedostatak aldosterona (Slika 5) u organizmu dovodi do hiperkalemije i hiponatremije, usled nemogućnosti razmene jona kalijuma i natrijuma u nefronima bubrega. Takođe se može javiti hipovolemija, kao posledica niskog nivoa natrijuma (Scott i sar. 2023, Ferreira i sar. 2021).



Slika 5. Aldosteron  
Izvor PUBCHEM

Pad aktivnosti aldosteron-sintaze dovodi do smanjene sinteze kortikosterona, za koji je utvrđeno da ima sličan efekat kao aldosteron. Takođe se može javiti preusmeravanje metaboličkih puteva holesterola ka proizvodnji androgena pomoću 17- $\alpha$ -hidroksilaze, što za posledicu može imati pojavu maskulinizacije kod žena. Ukoliko se javi nedostatak 17- $\alpha$ -hidroksilaze, holesterol se usmerava ka proizvodnji mineralokortikoida, što za posledicu ima anomaliju genitalija kod muškaraca i

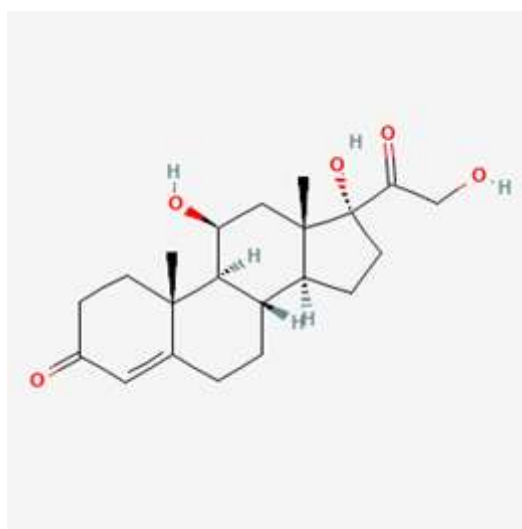
nedostatak sekundarnih polnih karakteristika kod žena, usled neadekvatne biosinteze glukokortikoida i androgena (Scott i sar. 2023).

S druge strane, povišen sadržaj aldosterona može biti značajan faktor rizika za nastanak hipertenzije, koronarne bolesti, moždanog udara i kongestivne srčane insuficijencije. Povišen nivo neiskorišćenog aldosterona dovodi do oksidacionog stresa i različitih inflamatornih stanja (Ferreira i sar. 2021).

### *Kortizol*

Kortizol (Slika 6) je glukokortikoid koji se luči iz kore nadbubrežne žlezde (*zona fascikulata*) pri odgovoru organizma na stres. Osim spoljašnjih stresora, na lučenje kortizola utiče i cirkadijalni ritam, jer su nivoi kortizola najviši ujutru (nekih 30 minuta nakon buđenja) i spontano opadaju tokom dana (Stachowicz i Lebedzińska, 2016; De Nys i sar. 2022). Biosinteza kortizola se odigrava u mitohondrijama ćelija posredstvom enzima hidrosisteroid-dehidrogenaza i citohroma P450 (Li i sar. 2012).

Nakon biosinteze, kortizol migrira u vanćelijski prostor i oslobađa se u krvotok. Kortizol je male mase i dobre lipidne rastvorljivosti, zbog čega do ciljnih ćelija dospeva pasivnom difuzijom (Lee i sar. 2015).



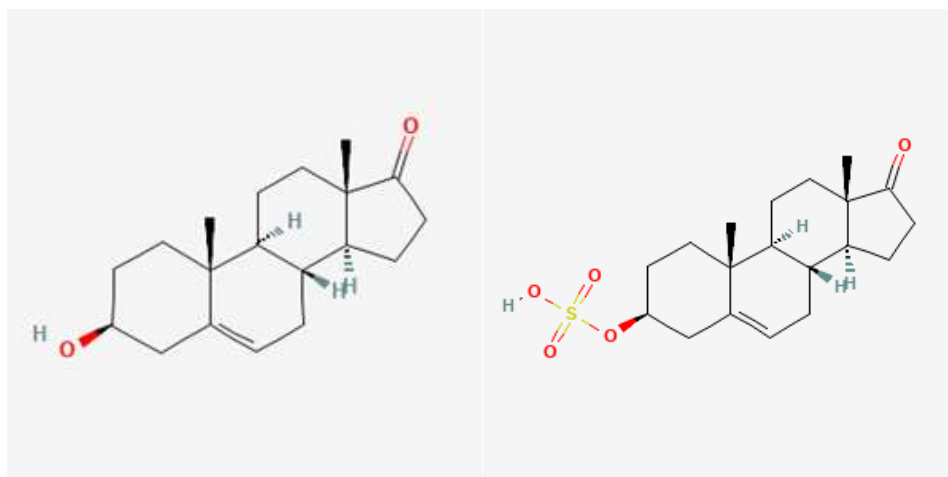
Slika 6. Kortizol  
Izvor: PUBCHEM

Kortizol ima uticaj na termoregulaciju i na regulaciju krvnog pritiska. Kortizol takođe ima uticaj na suprimiranje imunskog sistema. Pripada grupi ketogenih hormona, koji oponiraju delovanju insulina, što dovodi do porasta nivoa glukoze u serumu. Zabeleženo je da kortizol stimuliše rast adipocita i aktivira lipolizu, što utiče na pojavu gojaznosti (Dutt i sar. 2023). Takođe, kortizol stimuliše sintezu kolagena. Nedovoljno lučenja kortizola dovodi do nadbubrežne insuficijencije, poznatije kao Adisonova bolest (Stachowicz i Lebedzińska, 2016).

### *Nadbubrežni androgeni (DHEA (dehidroepiandrosteron) i DHEA-S)*

Dehidroepiandrosteron (3b-hidroksi-5-androsten-17-on, DHEA) se proizvodi u *zoni reticularis* kore nadbubrežne žlezde iz pregnenolona i dalje se prevodi u androstenedion, testosteron i estrogene (Aoki i Terauchi, 2018). Dehidroepiandrosteron se takođe proizvodi u ćelijama jajnika, Lejdigovim ćelijama testisa i mozgu. DHEA i njegov metabolit DHEA-S (Slika 7) nalaze se u visokim koncentracijama u cirkulaciji i čine prekursore za oko 75% estrogena kod žena u premenopauzi i oko 50% androgena kod muškaraca. Njihova koncentracija u krvotoku opada sa godinama života (Clark i sar., 2018).

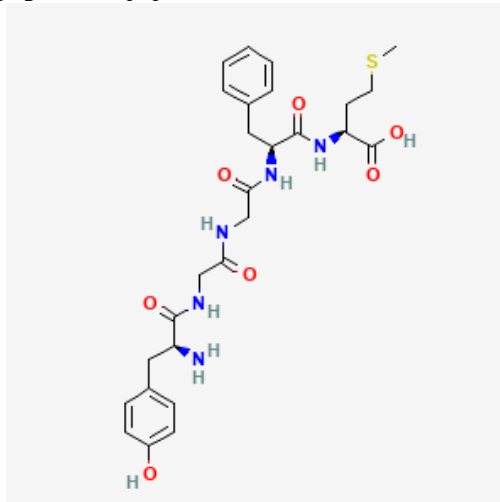
Nadbubrežni androgeni nisu dominantni kod odraslih muškaraca, jer su testisi glavni izvor testosterona. Međutim, androgeni nadbubrežne žlezde su ključni u pubertetu, kako za muškarce, tako i za žene i glavni su izvor cirkulatornog testosterona kod žena. Nakon menopauze, ekstragonadni estrogene i androgene se proizvode iz nadbubrežnih DHEA, DHEA-S i androstendiona (Clark i sar., 2018). Klinička istraživanja su pokazala da DHEA može imati neuroprotektivnu ulogu u pojedinim bolestima, uključujući maligne tumore (Webb i sar. 2006).



Slika 7. DHEA i DHEA-S  
Izvor: PUBCHEM

#### *Met-enkefalin*

Met-enkefalin (ili opioidni faktor rasta) (Slika 8) je endogeni peptid od 5 aminokiselina koji deluje kao antagonist zeta- i delta-opioidnim receptorima. To je jedan od prvih endogenih opioidnih peptida koji je otkriven (Murrin 2007).



Slika 8. Met-enkefalin  
Izvor: PUBCHEM

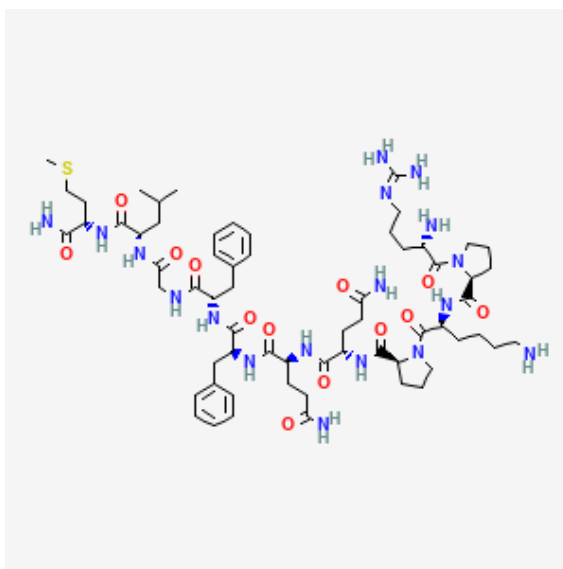
Ima uticaj na rast i regeneraciju tkiva, a smatra se da može imati i analgetičku, antiinflamatornu, neuro- i imunomodulatornu ulogu. Trenutno se u svetu ispituje potencijalna uloga met-enkefalina u lečenju određenih tipova kancera (McLaughlin i Zagon, 2012).

#### *Supstanca P*

Supstanca P (Slika 9) ima ulogu u stimulanju lučenja aldosterona i kortizola (Wils i sar. 2020, Iftikhar i sar. 2020). Takođe ima ulogu neuromodulatora u mozgu, jer



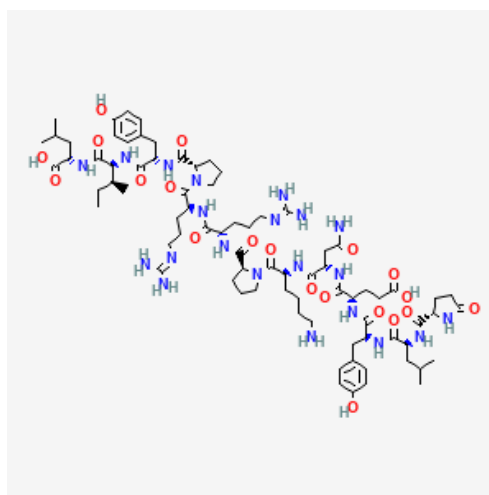
se nalazi u koordinaciji sa dopaminom, acetilholinom, noradrenalinom i drugim neurotransmiterima (Ifikhar i sar. 2020).



Slika 9. Supstanca P  
Izvor: PUBCHEM

### *Neurotenzin*

Neurotenzin (Slika 10) je izuzetno dobro proučena supstanca, sa preko 30 poznatih *in vitro* i *in vivo* efekata. Neke od poznatih uloga neurotenzina obuhvataju vazodilataciju, pojačano oslobađanje histamina, efekte na aktivnost i pokretljivost glatkih mišića gastrointestinalnog trakta, stimulaciju endokrinog i egzokrinog pankreasa, stimulaciju rasta nadbubrega, stimulaciju crevne sekrecije i inhibiciju protoka krvi u masno tkivo. Takođe, neurotenzin utiče na biosintezu luteinizirajućeg hormona i na oslobađanje prolaktina (Shulkes 2004, Nikolaou i sar. 2020).

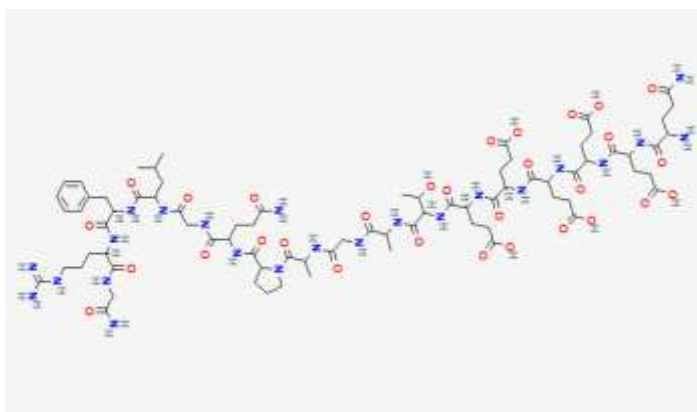


Slika 10. Neurotenzin  
Izvor: PUBCHEM

### *Hromogranin A*

Hromogranin A (Slika 11) je dobio naziv po mestu gde je otkriven u organizmu – u hromafinskim (hromafinim) ćelijama medule nadbubrežne žlezde. Nadbubreg je ujedno i glavni izvor ovog proteina (Deftos 1991). Hromogranin A može biti povišen u cirkulaciji usled prisustva CST, PCC i neuroendokrinih tumora uopšte, zbog čega se koristi kao pouzdani serumski tumorski biomarker (Gkolfinopoulos et al, 2017, Yang et

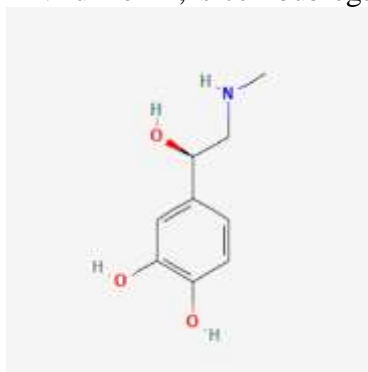
al, 2015). Takođe, ovaj protein utiče na održavanje homeostaze jona kalcijuma (D'amico i sar. 2014).



Slika 11. Hromogranin A  
Izvor: PUBCHEM

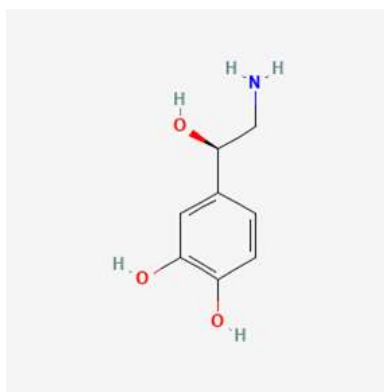
#### *Adrenalin (epinefrin) i noradrenalin (norepinefrin)*

Adrenalin (Slika 12) je kateholamin koji se proizvodi u meduli nadbubrežne žlezde, polazeći od prekursora tirozina i završavajući se sa metiljućim noradrenalinom (Bylund 2015). Predstavlja glavnog posrednika u “bori se ili beži” (engl. “fight-or-flight”) odgovora organizma usled stresa (Verberne i sar. 2016). Ključni enzim za prevođenje noradrenalina u adrenalin je feniletanolamin N-metiltransferaza (S-adenozil-L-metionin), čiji su glavni izvori upravo hromafinske (hromafine) ćelije medule nadbubrežne žlezde (Stanford 2013). Adrenalin ima široku primenu u medicini kao vazokonstriktor i sistemski antialergik (O'Shaughnessy 2012). Sistemski efekti adrenalina uključuju povećavanje brzine kontraktilnosti srčanog mišića, širenje bronhija, kao i povećanje dotoka krvi u mozak, srce i bubrege (Stanford 2013).



Slika 12. Adrenalin  
Izvor: PUBCHEM

Noradrenalin (Slika 13), kao i adrenalin, ima uticaj na “bori se ili beži” odgovor organizma. Poput adrenalina, noradrenalin utiče na povećanje nivoa glukoze u krvotoku, na cirkadijalni ritam i sužavanje krvnih sudova (vazokonstrikcija). Ima primenu u lečenju hipotenzije i šoknih stanja različite geneze (Smith i Maani 2023).

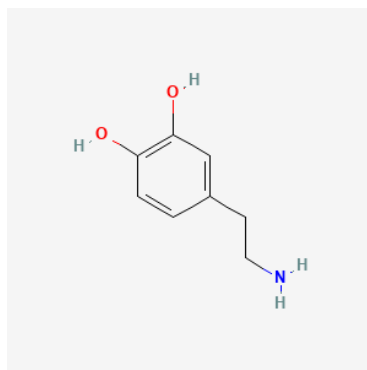


Slika 13. Noradrenalin  
Izvor: PUBCHEM

Nivoi kateholamina, niži ili viši od fizioloških, čine osnovu patogeneze kardiovaskularnih, metaboličkih i brojnih drugih oboljenja (Lepeschkin et al, 1960; Foulon i De Backer 2018).

### *Dopamin*

Dopamin (Slika 14) je kateholamin koji igra ulogu prekursora noradrenalina i adrenalina (Juárez Olguín i sar. 2016). Receptori za dopamin prisutni su u korteksu nadbubrežne žlezde i određenim moždanim strukturama. Dopamin ima brojne uloge u organizmu, od regulisanja ponašanja i pokreta do uticaja na kardiovaskularne, endokrine, gastrointestinalne, imunske i bubrežne funkcije (Sarkar i sar. 2010). Svoju primenu ima u lečenju niskog krvnog pritiska, izostanka mokrenja, kao i pri zastoju srca. Deregulacija nivoa dopamina ili poremećaj u funkcionisanju njegovih signalnih puteva može dovesti do nastanka PCC i drugih oboljenja endokrinog sistema (Sonne i sar. 2023).



Slika 14. Dopamin  
Izvor: PUBCHEM

## **2.3. Renin-angiotenzin-aldosteron sprega (RAAS)**

Regulacija oslobađanja aldosterona iz nadbubrega strogo je regulisana RAAS-om (Slika 15). Ovaj sistem reguliše zapreminu krvi i arterijskog tonusa reapsorpcijom natrijuma, vode i širenjem vaskularnog tonusa. Aktivacija ovog složenog sistema počinje snižavanjem srednjeg arterijskog pritiska, koji utiče na pojačano lučenje prorenina u juksaglomerularnim (JG) ćelijama bubrega (Scott et al, 2023; Fountain i sar. 2023).

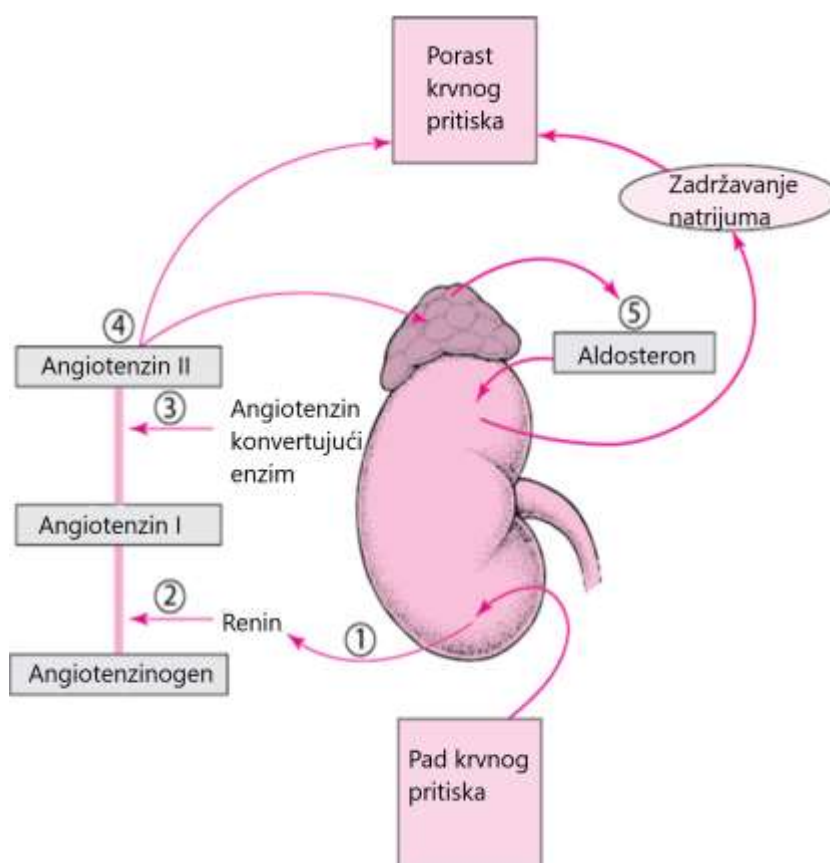
Oko 80% proizvedenog prorenina se, u fiziološkim uslovima, izlučuje van ćelija u neizmenjenom obliku. Prorenin ima malu enzimsku aktivnost (Martyniak i Tomasik, 2022). Aktivacijom JG ćelija, prorenin se prevodi u enzim renin. Biosinteza renina je kontrolisana od strane više faktora, jedan od njih je angiotenzin II koji deluje

inhibitorno. Takođe, povišeni nivoi jona kalcijuma u citoplazmi JG ćelija deluju inhibitorno na biosintezu renina (Fountain i sar. 2023; Martyniak i Tomasik, 2022).

Renin se nakon biosinteze oslobađa u krvotok (Slika 15), gde deluje na protein angiotenzinogen, koji luče hepatociti. Iako su hepatociti glavni izvor angiotenzinogena, on se takođe luči od strane nadbubrega, mozga, bubrega, srca i adipocita (Martyniak i Tomasik, 2022). Angiotenzin I je fiziološki neaktivan i služi kao prekursor angiotenzina II (Slika 15). Prevođenje angiotenzina I u II vrši angiotenzin konvertujućeg enzima (engl. angiotensin converting enzyme - ACE). Angiotenzin konvertujući enzim se prvenstveno nalazi u vaskularnom endotelu pluća i bubrezima (Scott i sar. 2023; Fountain i sar. 2023).

Angiotenzin II u plazmi ima kratko poluvreme eliminacije - svega dva minuta, nakon čega dolazi do njegove razgradnje delovanjem specifičnih peptidaza. Angiotenzin II deluje na povećanje reapsorpcije jona natrijuma u bubrezima, što za posledicu ima porast arterijskog pritiska. Takođe utiče na lučenje aldosterona, delujući time na *zonu glomerulozu* (Scott i sar. 2023). Aldosteron se vezuje za nuklearne receptore ciljnih ćelija i utiče na reapsorpciju jona natrijuma i povećanje krvnog pritiska. Zbog mesta vezivanja aldosterona, efekti koje on ostvaruje su dugotrajniji u odnosu na angiotenzin II, čiji su efekti brži i kratkotrajniji (Fountain i sar. 2023).

Nedovoljno lučenje renina izaziva povišen arterijski krvni pritisak, povećan volumen krvi i oštećenje pojedinih organa (Martyniak i Tomasik, 2022), dok nedovoljno lučenje angiotenzina II može izazvati hiperkalemiju, hiponatremiju i pad krvnog pritiska.

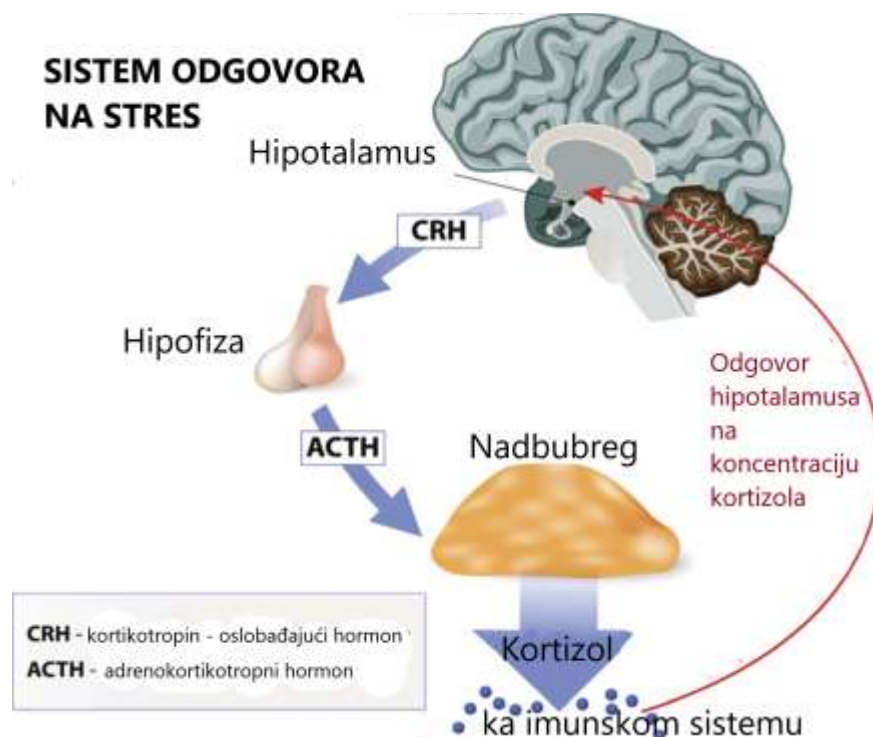


Slika 15. Renin-angiotenzin-aldosteron sprega

Izvor: <https://www.msmanuals.com/home/multimedia/figure/regulating-blood-pressure-the-renin-angiotensin-aldosterone-system>

## 2.4. Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda

Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis – HPA) (Slika 16) igra ključnu ulogu u regulaciji fizioloških procesa na spoljašnje stresore, utičući time na autonomni nervni sistem, kogniciju, ponašanje, varenje hrane, metabolizam i imunski odgovor. Ovaj složeni sistem čine tri ključne komponente: hipotalamus, prednji režanj hipofize i nadbubrežne žlezde (Sheng i sar. 2021, Gabry i sar. 2022) (Slika 16). Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda osa predstavlja neuroendokrinu vezu između spoljašnjeg stresora i fiziološkog odgovora na stres (Dunlavey 2018).



Slika 16. HPA osa

Izvor: <https://www.verywellhealth.com/hypothalamic-pituitary-adrenal-hpa-axis-5222557>

Dakle, HPA osovina se aktivira usled odgovora organizma na fizički/fiziološki stres (povreda, bol, operacija, hipoglikemija, intenzivna fizička aktivnost) ili psihološki stres (npr. anksioznost, depresija). Prvi korak u pokretanju HPA osovine uključuje aktiviranje hipotalamusa i lučenje kortikotropin-oslobađajućeg hormona (engl. corticotropin-releasing hormone - CRH) direktno u krvotok i lučenje vazopresina. Vazopresin i CRH dalje deluju na prednji režanj hipofize, tačnije na kortikotropne ćelije, koje imaju ulogu u biosintezi, skladištenju i lučenju adrenokortikotropnog hormona (engl. adrenocorticotrophic hormone - ACTH). Kada se oslobodi u krvotok, ACTH se preusmerava ka ciljnim ćelijama u korteksu nadbubrežne žlezde. ACTH podstiče biosintezu kortizola, koji igra ulogu u metabolizmu glukoze, tj. snabdevanju organizma energijom. Kortizol takođe utiče na smanjenje osećaja bola (Burtis i sar. 2012). Kortizol deluje sistemom negativne povratne sprege na CRH i vazopresin u hipotalamusu, kao i na ACTH u hipofizi. Kod zdravih osoba, kortizol se luči u cirkadijalnom ritmu; nivoi padaju tokom dana i najniži su oko ponoći, da bi ponovo počeli da rastu oko 2 sata posle ponoći (Juszczak i sar. 2021). Kortizol deluje na dve vrste receptora, mineralokortikoidne i glukokortikoidne receptore. Iako su koncentracije kortizola u cirkulaciji značajno veće, prevođenjem kortizola u kortizon na nivou tubula bubrega, aldosteron se vezuje u većoj meri za mineralokortikoide receptore i tako

ostvaruje svoje efekte. Ovaj kortizol-kortizonski šant biva nadvladan u uslovima značajno povišenih koncentracija kortizola, kao npr. u CST. Takođe, kortizol igra ulogu u regulaciji aktiviranja HPA osovine u odnosu na doba dana (Herman i sar. 2016).

## **2.5. Benigni tumori nadbubrežne žlezde**

### **2.5.1. Adrenalni adenomi**

Adrenalni adenomi (AA) su benigni tumori obično lokalizovani u kori nadbubrežne žlezde (Mahmood i Anastasopoulou, 2020). Najčešće se otkrivaju slučajno (tzv. incidentalomi), prilikom kompjuterizovane tomografije (CT) abdomena i/ili grudnog koša. Najveći procenat incidentaloma (oko 75%) nije maligne prirode (Elbanan i sar. 2020). Novije studije ukazuju na porast oboljevanja od AA, a sam uzrok još uvek nije potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da je jedan od uzroka učestalija primena magnetne rezonancije, scintigrafije i CT-atokom dijagnostikovanja oboljenja koja nisu nadbubrežne prirode.

Rezultati obdukcijских studija pokazali su da se AA češće javljaju kod žena (55%) nego kod muškaraca (45%), kao i kod ljudi starijih od 55 godina (Mahmood i Anastasopoulou, 2020; Singh i Buch 2008). Prevalenca AA je izuzetno niska kod dece i adolescenata i čini 0.3-0.4% svih tumora koji se javljaju u tom životnom dobu. Međutim, precizni podaci o pravoj incidenci ovih oboljenja još uvek nedostaju. Kliničke studije su pokazale da se u 10-15% dijagnostikovanih slučajeva AA mogu detektovati na oba nadbubrega (Chatzellis i Caltsas, 2019).

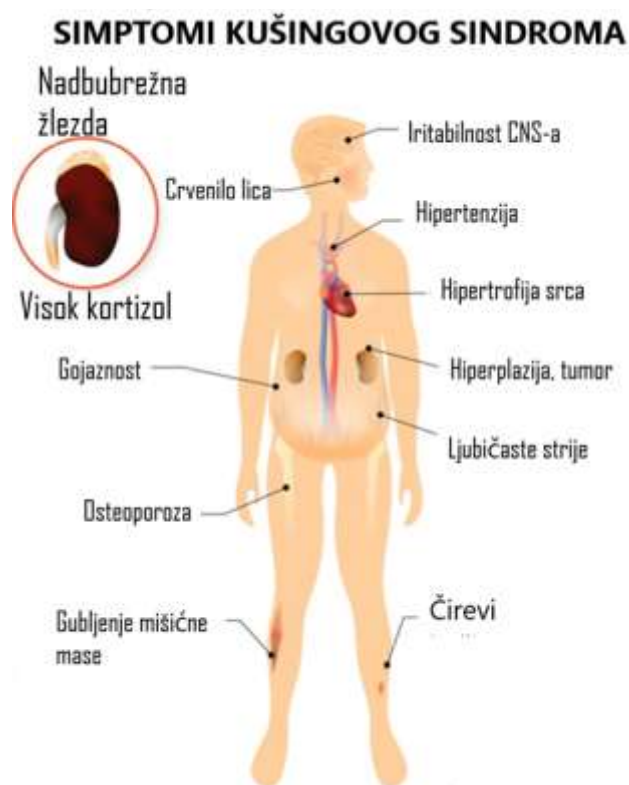
Adrenalni adenomi su uglavnom asimptomatski i afunkcionalni, jer ne sekretuju hormone, premda u retkim slučajevima mogu biti i sekretujući (funkcionalni) adenomi. Sekretujući AA izazivaju značajne kliničke sindrome, poput Kušingovog ili Konovog sindroma (primarni aldosteronizam), a može se javiti i sindrom uzrokovan ekscesom nadbubrežnih androgena, praćen fenomenom maskulinizacije (niži nivo androgena) do ekstremne virilizacije (razvoj sekundarnih muških polnih karakteristika kod žena) (Lonser et al, 2017; Kobayashi i sar. 2019).

Prema preporukama Evropske mreže za proučavanje adrenalnih tumora (eng. European Network for the Study of Adrenal Tumors, ENSAT) iz 2016. godine, aktuelna dijagnostička obrada adrenalnih oboljenja podrazumeva ispitivanje prirode adrenalne mase (maligna ili benigna), kao i njenu sekretornost. Najčešća dijagnostička tehnika koja se koristi za procenu adrenalne mase je CT abdomena, dok se biohemijским analizama hormona iz uzorka krvi potvrđuje ili odbacuje da li je formirana adrenalna masa sekretujuća ili ne. Ukoliko je tehnički izvodljiv, najsvrsishodniji terapijski pristup u rešavanju tumora nadbubrežne žlezde je hirurški (adrenalektomija). Međutim, ukoliko oboleli nisu pogodni za hirurško lečenje, primenjuje se medikamentna terapiji, na prvom mestu antagonistima steroidogeneze i aldosterona, ali i drugim lekovima (Mahmood i Anastasopoulou, 2020).

### **2.5.2. Kušingov sindrom**

Kušingov sindrom se karakteriše lučenjem visokih koncentracija kortizola, tj. hiperkortizolemijom. Uzrok Kušingovog sindroma može biti poremećaj u radu kore nadbubrežne žlezde ili učestala primena sintetskih glukokortikoida, koji se koriste u imunosupresivne ili antiinflamatorne svrhe, npr. kod tretmana oboljenja poput hronične opstruktivne bolesti pluća, Kronove bolesti, sistemskog lupusa, osteoartrisa i brojnih drugih. Endogeni Kušingov sindrom se ređe javlja kod pacijenata u odnosu na egzogeni Kušingov sindrom, koji se javlja usled primene glukokortikoidne terapije (Raff i sar. 2014). Učestalost endogenog Kušingovog sindroma je 2-4 dijagnostikovana slučaja na milion stanovnika godišnje (Lahera Vargas i da Costa, 2009).

Poznata su dva opšta uzroka endogenog hiperkortizolizma — Kušingov sindrom zavisan od ACTH i Kušingov sindrom nezavisan od ACTH. Prekomerno lučenje kortizola koji je zavisan od ACTH najčešće je uzrokovan Kušingovom bolešću — tumorom kortikotropnih ćelija hipofize, što za posledicu ima hiperfunkciju nadbubrežne žlezde. Kušingov sindrom koji je ACTH nezavisan obično je posledica adrenalnih adenoma kore nadbubrežne žlezde. Iako se izuzetno retko javlja, karcinom nadbubrežne žlezde može biti i uzrok Kušingovog sindroma. Najčešći simptomi koji se javljaju kod pacijenata sa ovim sindromom ne moraju se pripisati isključivo ovom oboljenju (Slika 17). Naime, povišen krvni pritisak, dijabetes, gojaznost, hroničan umor i poremećaji menstrualnog ciklusa mogu biti simptomi mnogih drugih oboljenja. Osim navedenih nespecifičnih simptoma, kod obolelih od Kušingovog sindroma se učestalije pojavljuju modrice i ljubičaste strije, kao i sklonost infekcijama kože. Ukoliko se javi kod dece, može uzrokovati zastoj u rastu (Raff i sar. 2014, Lahera Vargas i da Costa, 2009).



Slika 17. Simptomi Kušingovog sindroma

Izvor: <https://www.ohsu.edu/brain-institute/cushing-disease-cushing-syndrome>

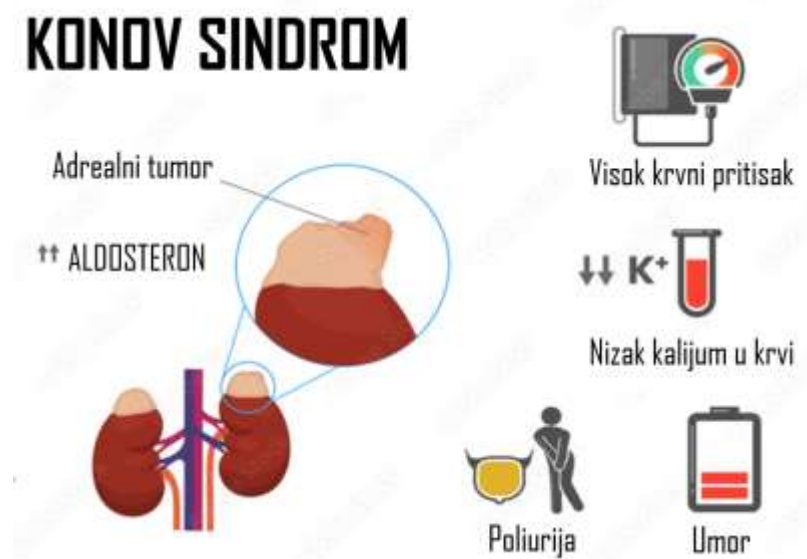
Osim pomenutih simptoma, višak kortizola može izazvati atrofiju skeletnih mišića, dislipidemiju, atrofiju kože i progresivnu osteoporozu (Raff i sar. 2014, Lahera Vargas i da Costa, 2009).

Uobičajeno se Kušingov sindrom leči hirurškim putem, iako se može primeniti radio- i/ili medikamentna terapija (Lahera Vargas i da Costa, 2009).

### 2.5.3. Konov sindrom

Konov sindrom karakteriše se pojačanim lučenjem aldosterona, zbog čega se najčešće naziva primarnim hiperaldosteronizmom. Pacijenti oboleli od Konovog sindroma imaju povišen krvni pritisak, hroničan umor, poliuriju, slabost u mišićima, a usled povećane reapsorpcije jona natrijuma i smanjene koncentracije jona kalijuma može se javiti hronična bolest bubrega, moždani udar, ishemijska bolest srca i kongestivna

srčana insuficijencija. Pacijenti mogu da razviju i hipokalemiju, metaboličku alkalozu i poremećaj lučenja insulina (Parmar i Singh, 2022) (Slika 18).



Slika 18. Simptomi Konovog sindroma

Izvor: <https://stock.adobe.com/images/conn-s-syndrome-causes-and-symptoms-vector-illustration-primary-aldosteronism-scientific-medical-illustration/453685965>

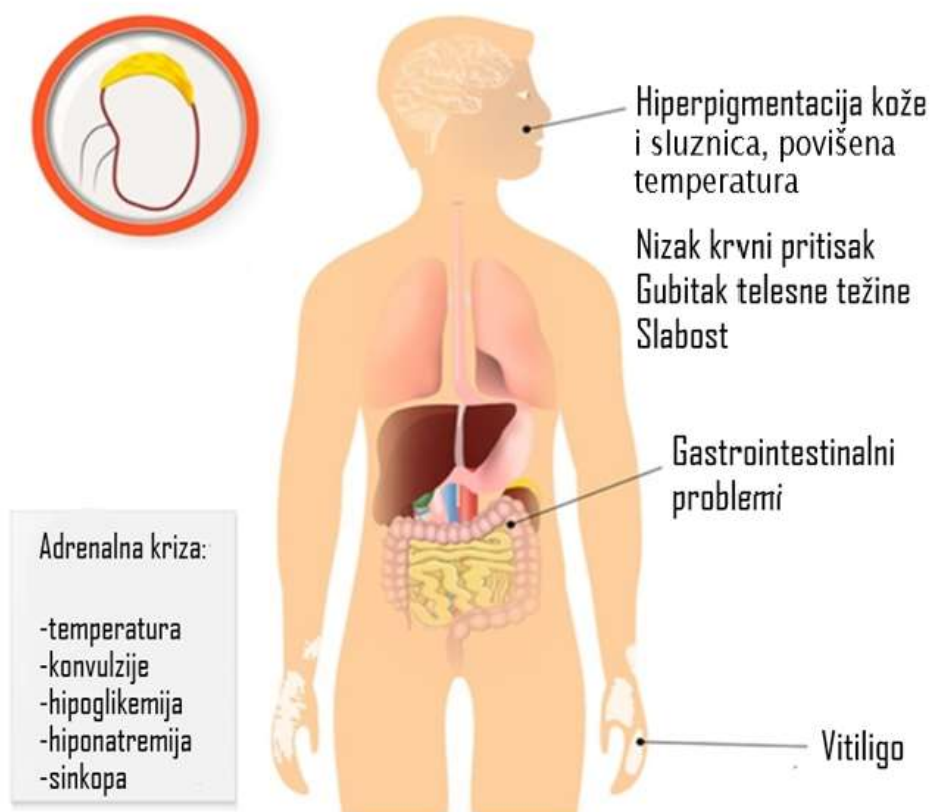
Primarni uzroci nastanka Konovog sindroma su adenomi nadbubrežnih žlezdi, koji se mogu javiti na jednom ili oba nadbubrega (Schirpenbach i Reincke, 2007). Lečenje ovog oboljenja podrazumeva primenu lekova iz grupe antagonista mineralokortikoidnih receptora. Ukoliko pacijenti ispunjavaju uslove za operaciju, češće se podvrgavaju laparoskopskoj nego otvorenoj adrenaletomiji, jer je uzročni solitarni AA najčešće promera  $\leq 1$  cm (Rossi i sar. 2008).

#### 2.5.4. Adisonova bolest (adrenalna insuficijencija)

Adisonovu bolest karakteriše nedovoljno lučenje aldosterona i kortizola i može se javiti usled trajnog oštećenja kore nadbubrežne žlezde, nakon ozbiljne infekcije ili biti autoimunskog uzroka. Drugačiji naziv za ovo oboljenje je primarna adrenalna insuficijencija ili hipoadrenalizam. Prema epidemiološkim podacima, 4-11 osoba na 100.000 ljudi godišnje oboli od ove bolesti, a najčešće se javlja između 30. i 50. godine života. Takođe, Adisonova bolest se češće javlja kod žena nego kod muškaraca, a primećeno je da postoji i porodična opterećenost (Burton i sar. 2015; Munir i sar. 2023).



# ADISONOVA BOLEST



Slika 19. Simptomi Adisonove bolesti

Izvor: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Addisons-Disease.aspx>

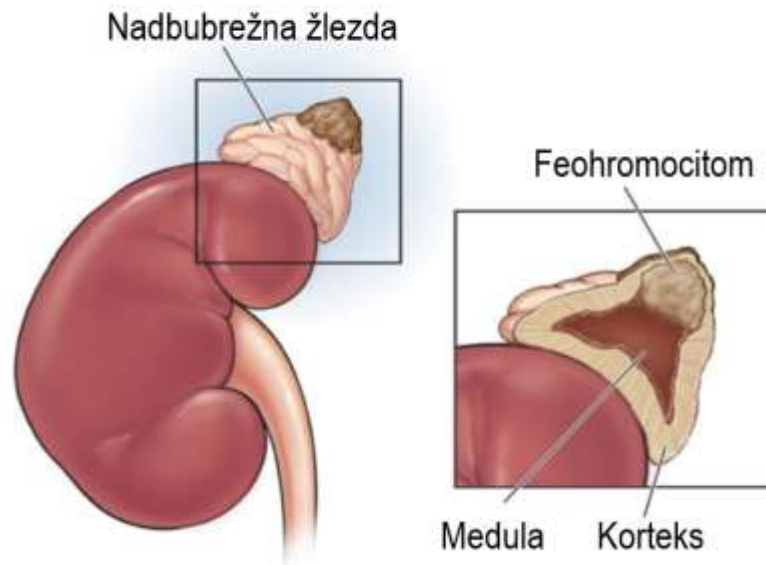
Kao i većinu drugih oboljenja nadbubrega, Adisonovu bolest odlikuju nespecifični simptomi u početnim fazama bolesti, poput vrtoglavice, glavobolje, gubitka apetita i telesne težine (Slika 19). Nakon uspostavljanja dijagnoze, pacijenti sa trajnim oštećenjem kore nadbubrega se doživotno supstituišu glukokortikoidima i mineralokortikoidima (Burton i sar. 2015; Munir i sar. 2023).

## 2.6. Benigno oboljenje sa izraženim malignim potencijalom

### 2.6.1. Feohromocitom

Feohromocitom (Slika 20) je redak benigni tumor hromafinih ćelija medule nadbubrežne žlezde, za koji je karakteristično da sekretuje katecholamine (Eisenhofer i Peitzsch, 2014; Därr i sar. 2012). Feohromocitom je značajan uzrok morbiditeta i smrtnosti, pogotovo ukoliko ostane nedijagnostikovano (Tsirlin i sar. 2014; Zuber i sar. 2011, Lloyd 2011) Utvrđeno je da se PCC javlja do 0,1% u opštoj populaciji i kod približno 0,2% pacijenata koji boluju od povišenog krvnog pritiska. Najčešće se javlja tokom četvrte i pete decenije života sa gotovo podjednakom učestalošću kod muškaraca i žena. S'obzirom na to da ne pokazuje karakterističnu kliničku sliku (glavobolja, tahikardija, pojačano znojenje, anksioznost, itd.), dijagnoza PCC se najčešće postavi kasno. Oko 13% dijagnostikovanih PCC može biti maligne prirode (Meijs i sar. 2021; Zdrojowy-Wehna i Bednarek-Tupikowska 2014; Grassi i sar. 2019).

# FEOHROMOCITOM



Slika 20. Feohromocitom

Izvor: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/23373-pheochromocytoma>

Dobra klinička praksa u dijagnostikovanju PCC podrazumeva određivanje nivoa kateholamina ili njihovih metabolita, normetanefrina i metanefrina u urinu i/ili u plazmi. Veliki broj kliničkih studija ukazao je da merenje ovih metabolita pruža izuzetno visoku dijagnostičku osetljivost od čak 96% (Därr i sar., 2012; Zdrojowy-Wełna i Bednarek-Tupikowska 2014). Nakon biohemijskih testova koji potencijalno ukazuju na postojanje PCC, pristupa se CT pregledu abdomena i karlice, kako bi se lokalizovao tumor/i ili isključio lažno pozitivan laboratorijski nalaz. Osim CT-a, može se pristupiti i magnetnoj rezonanciji ili pozitron-emisionoj tomografiji (PET). Ukoliko se postavi dijagnoza PCC, pristupa se hirurškom lečenju - laparoskopskoj ili otvorenoj adrenalektomiji, nakon posebne preoperativne pripreme. Važno je napomenuti da postoji značajan rizik od ponovne pojave PCC nakon nehirurškog lečenja, dok se hirurškim lečenjem šanse smanjuju na 3%. Pacijentima se najmanje jednom godišnje i doživotno prati hormonski status, kako bi se na vreme uočio potencijalni recidiv (Gupta i Marwaha, 2023).

## 2.7. Maligni tumori nadbubrežne žlezde

Nadbubrežno tkivo retko predstavlja primarno mesto za razvoj malignih tumora, pa se najveći malignih bolesti nadbubrega razvija usled metastatskog širenja maligno izmenjenih ćelija iz drugih organa, poput pluća, dojke, jednjaka, tankog creva, rektuma ili bubrega. Sekundarni depoziti koji se javljaju na nadbubrezima primarno su posledica njihove dobre prokrvljenosti. Nadbubrežne žlezde zauzimaju četvrto mesto po metastatskom širenju malignoma. Godišnja učestalost nemetastatskih malignih tumora nadbubrežne žlezde iznosi 4-12 slučajeva na milion stanovnika. Iako retki, maligni tumori nadbubrežne žlezde su najčešće izuzetno agresivni oblici karcinoma sa lošom prognozom. Trenutni modeliteti lečenja malignih tumora nadbubrega podrazumevaju na prvom mestu hirurško lečenje, sa ili bez hemioterapije/radioterapije (Almeida i sar. 2019; Lloyd 2011).

### **2.7.1. Adrenokortikalni karcinom**

Adrenokortikalni karcinom je redak i veoma agresivan tumor nadbubrežne žlezde sa lošom prognozom. Patogeneza ovog primarnog karcinoma kore nadbubrega nije razjašnjena. Godišnje se javlja kod 1-2 pacijenta na milion stanovnika i češći je kod žena (55-60% slučajeva). Najčešće se javlja u prvoj deceniji života ili između 40. i 50. godine života. Istraživanja sprovedena u poslednjih nekoliko decenija ukazala su da je nastanak ovog malignog tumora povezan sa inaktivacijom određenih tumor-supresornih gena i aktivacijom velikog broja onkogeni (Fassnacht i sar. 2012; Thampi i sar. 2020).

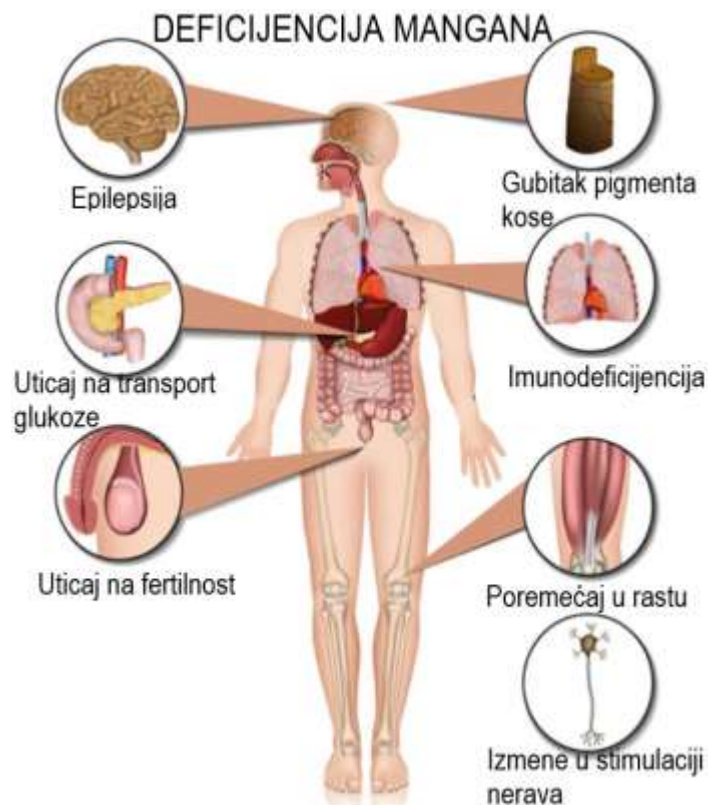
Trenutno je najuspešiji način lečenja ovog karcinoma hirurško uklanjanje tumorske mase, iako je verovatnoća recidiva nakon operacije između 19% i 34% (Libe 2015). Nakon operativnog lečenja, sprovodi se primena hemioterapije sa skromnim rezultatima, dok se radioterapija primenjuje veoma retko, zbog naglašene radiorezistencije tumora.

## **2.8. Esencijalni mikroelementi**

Esencijalni mikroelementi (Mn, Cu, Co, Zn, Se) imaju brojne uloge u organizmu, od regulisanja hormona, proteina, imunskog sistema, pravilnog rada celokupnog metabolizma do učešća u oksido-redukcionim procesima. Nedovoljne količine esencijalnih mikroelemenata (deficijencija) dovode do ozbiljnih zdravstvenih posledica, poput poremećaja metaboličkih funkcija i pojave različitih oboljenja, a slučajevi izuzetno smanjenog unosa esencijalnih mikroelemenata mogu dovesti do smrti. Takođe, bitno je na pomenuti da prekomeran unos može imati štetan efekat, tako da je optimalan unos esencijalnih mikroelemenata od ključne važnosti za pravilno funkcionisanje organizma (Guan i sar. 2024; Frydrych i sar. 2023).

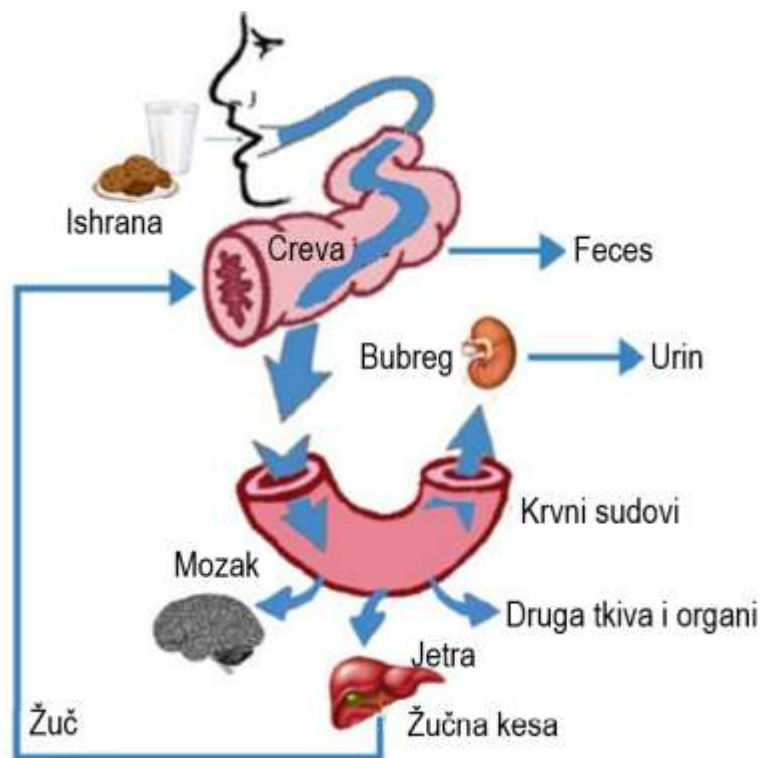
Mangan (Mn), esencijalni mikroelement kao kofaktor katalaze i mangan-superoxid-dismutaze (MnSOD), ima ulogu u uklanjanju slobodnih radikala u organizmu. Takođe, ima ulogu u pravilnom funkcionisanju nervnog, imunskog i reproduktivnog sistema, pravilnog razvoja kostiju i vezivnih tkiva, kao i u koagulaciji krvi. Kada dospe u organizam putem ishrane, Mn se apsorbuje u tankom crevu aktivnim transportom. Ukoliko su količine unetog Mn izuzetno visoke, pretpostavlja se da ovaj mikroelement može da se apsorbuje i pasivnom difuzijom. Nakon apsorpcije, deo Mn ostaje slobodan, dok se veliki procenat vezuje za transferin, albumin i  $\alpha$ 2-makroglobulin u plazmi (Buchman i sar. 2014).

Nedovoljne koncentracije Mn povezane su sa oboljenjima poput osteoporoze, a mogu izazvati i smanjenu proizvodnju glukoze, dok prekomerne količine ovog elementa mogu prouzrokovati neurotoksičnost. Srednja vrednost koncentracije Mn u uzorcima pune krvi srpske odrasle populacije iznosi  $14.5 \pm 7.0$  ng/g (Stojsavljević i sar. 2020).



Slika 21. Simptomi deficijencije mangana  
Izvor: <https://www.beingtheparent.com/manganese-for-babies-sources-and-benefits/>

Deficijencija Mn kod zdravih osoba nikada nije zabeležena, s'obzirom na to da se dovoljne količine ovog mikroelementa mogu uneti u organizam putem ishrane. Deficijencija Mn zabeležena je kod osoba na parenteralnoj ishrani uz propratne simptome, poput dermatitisa, smanjenog nivoa holesterola u serumu, usporenog rasta kose i noktiju, povećane koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu, povećane aktivnosti alkalne fosfataze, smanjene plodnosti i poremećaja u metabolizmu ugljenih hidrata, lipida i proteina (Slika 21) (Jagodić i sar. 2022; Avila i sar. 2019). Prekomerna koncentracija Mn u organizmu obično je posledica profesionalnog izlaganja ili se javlja kod osoba koje žive u blizini rudnika ili fabrika (Avila i sar. 2019).



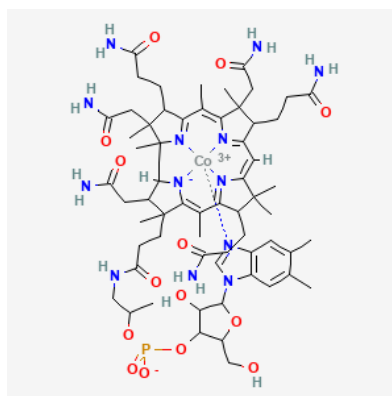
Slika 22. Transport bakra kroz organizam

Preuzeto:

[https://www.researchgate.net/publication/237145336\\_Dietary\\_Copper\\_and\\_the\\_Brain/figures](https://www.researchgate.net/publication/237145336_Dietary_Copper_and_the_Brain/figures)

Bakar (Cu), osim uloge kofaktora u mnogim enzimima (poput bakar,cink-superoksid-dismutaze CuZnSOD, ceruloplazmina, citohrom-*c*-oksidaze) i u antioksidativnoj zaštiti, neophodan je za i pravilno funkcionisanje metabolizma gvožđa i glukoze, za optimalne neuroendokrine funkcije, formiranje kolagena i eritrocita. Takođe, Cu učestvuje u sintezi noradrenalina i dopamina doprinoseći aktivnosti enzima dopamin- $\beta$ -hidroksilaze. Bakar se nakon ingestije pretežno apsorbuje u duodenumu, pa se u proseku 80-90% ukupnog Cu izluči putem fecesa (Slika 22). Deficijencija Cu je retka kod zdravih osoba, premda je zabeleženo da do deficijencije mogu dovesti urođene genetske mutacije. Simptomi koji najčešće prate deficijenciju ovog esencijalnog mikroelementa obuhvataju smanjenu funkciju centralnog nervnog sistema (CNS), anemiju, lomljive kosti, dijareju, mentalnu retardaciju, negativan uticaj na imunski sistem i pojavu neutropenije. Sa prekomernim koncentracijama Cu povezana su oboljenja poput Vilsonove bolesti, anemije, leukemije, limfoma i mnoga druga (Orians i sar. 2000; Collins 2017). Srednja vrednost koncentracije bakra u uzorcima pune krvi odrasle srpske populacije iznosi  $1019 \pm 205 \mu\text{g/kg}$  (Stojsavljević i sar. 2022).

Kobalt (Co) se u ljudskom organizmu može naći u obliku kobalamina (vitamina B12) (Slika 23). Kobalamin je kofaktor metilmalonil-CoA-mutaze i metionin-sintaze, koji su značajni za metabolizam proteina, lipida i nukleotida (Yamada 2013). Kobalamin igra ključnu ulogu u eritropoezi, sintezi neurotransmitera i mijelina. Nedovoljne količine Co najčešće su posledica disregulacije u apsorpciji vitamina B12, što može izazvati pojavu perniciozne anemije i smanjenje tiroidne funkcije. S druge strane, prekomeran unos Co utiče na hipercelularnost koštane srži i pojačanje rada štitaste žlezde, što može dovesti do prekomerne proizvodnje eritrocita, kao i do pojave fibroze pluća i astme kod profesionalno izloženih ljudi (Leyssens i sar. 2017).

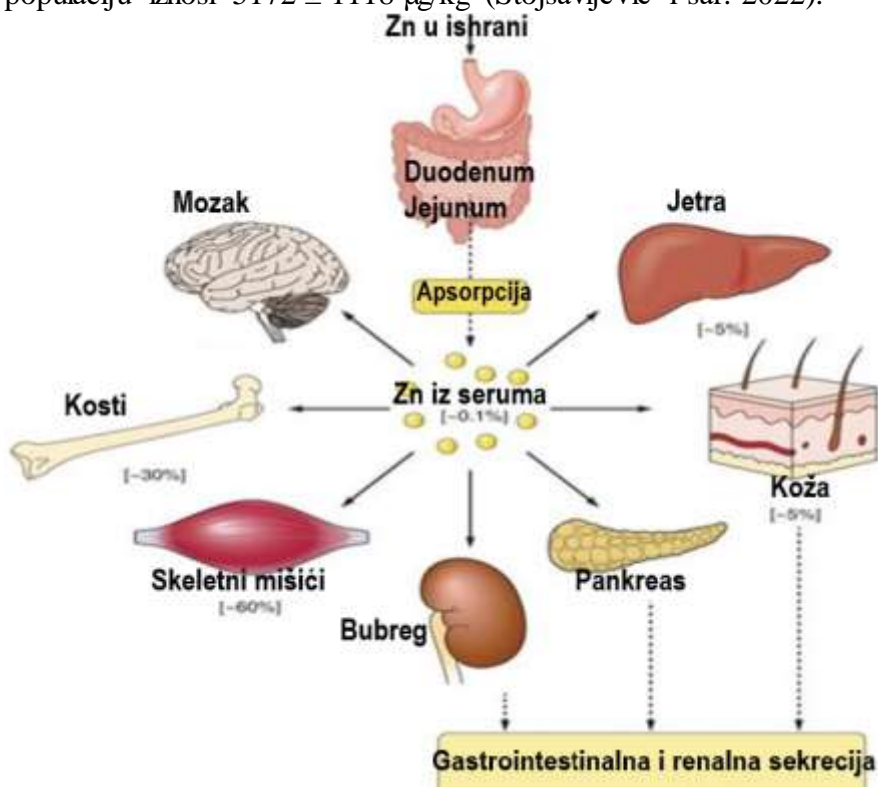


Slika 23. Kobalamin

Izvor sajta: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cobalamin-1#section=2D-Structure>

Neke od mnogobrojnih uloga cinka (Zn) u organizmu su uticaj na pravilno funkcionisanje imunskog, endokrinog i reproduktivnog sistema, odbrana od oksidativnog stresa, stabilizacija ribozoma, sinteza DNK, zaceljivanje rana i rast ćelija (Slika 24). Cink se u organizam unosi pretežno putem hrane. Utvrđeno je da fitati, fosfati i kalcijum imaju negativan uticaj na apsorpciju Zn u organizmu. Takođe, nedovoljne koncentracije Zn zalebežene su kod osoba na parenteralnoj i vegetarijanskoj ishrani (Costa i sar. 2023; Lönnerdal 2000).

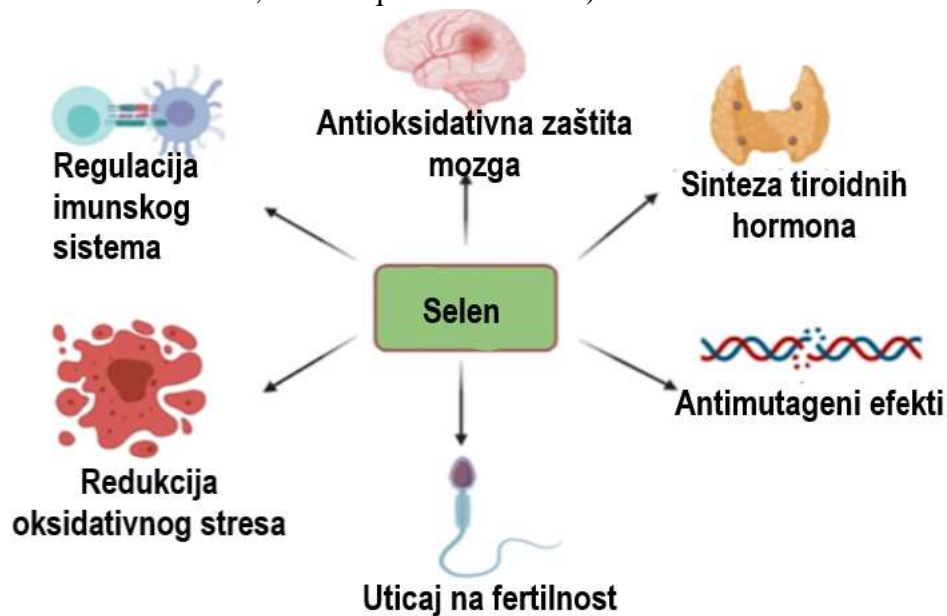
Deficit Zn može biti usko povezan sa prisustvom nekog hroničnog oboljenja, poput srpaste anemije, oboljenja jetre, bubrega i gastro-intestinalnog trakta (GIT), insuficijencije pankreasa, dijabetesa i HIV-infekcije (Maxfield i sar. 2024). Prekomerne koncentracije Zn su najčešće posledica profesionalnog izlaganja ili prekomerne suplementacije, a mogu izazvati promene u statusu Cu, gvožđa (Fe), što za posledicu dovodi do anemije. Srednja vrednost koncentracije Zn u uzorcima pune krvi za našu odraslu populaciju iznosi  $5172 \pm 1118 \mu\text{g/kg}$  (Stojsavljević i sar. 2022).



Slika 24. Zastupljenost Zn u organizmu

Preuzeto: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00035.2014>

Selen (Se), kao deo selenoproteina, igra važnu ulogu u održavanju ispravne strukture DNK, u sintezi tiroidnih hormona i pravilnom funkcionisanju štitaste žlezde, reproduktivnog, imunskog i kardiovaskularnog sistema (Sheeranth et al 2023) (Slika 25). Selenoproteini štite ćelije od oksidativnog stresa uklanjajući slobodne radikale kiseonika i azota, čime sprečavaju oštećenje ćelija. Selen služi kao ključna komponenta enzima uključenih u prevođenje tiroksina (T4) u trijodotironin (T3). Ovi tiroidni hormoni igraju značajnu ulogu u regulisanju metabolizma, rasta i razvoja i proizvodnji energije (Shreenath et al 2023; MacFarquhar i sar. 2010).



Slika 25. Zastupljenost i uloge Se u organizmu

Preuzeto: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-021-02716-z>

Procenjuje se da od 500 miliona do jedne milijarde ljudi širom sveta ima deficijenciju ovog esencijalnog elementa. Nedovoljan unos Se primarno je posledica njegovog manjka u zemljištu, što direktno utiče na koncentracije Se u hrani i vodi. Snižene koncentracije Se u krvotoku mogu izazvati brojne zdravstvene probleme, poput Kešanove bolesti, Kašin-Bekove bolesti, smanjene plodnosti kod muškaraca, učestaliju pojavu infekcija, poremećaje u radu tiroidne žlezde. Prekomeran unos Se može dovesti do opadanja kose, krutih noktiju, GIT simptoma i dr. (Shreenath et al 2023; MacFarquhar i sar. 2010).

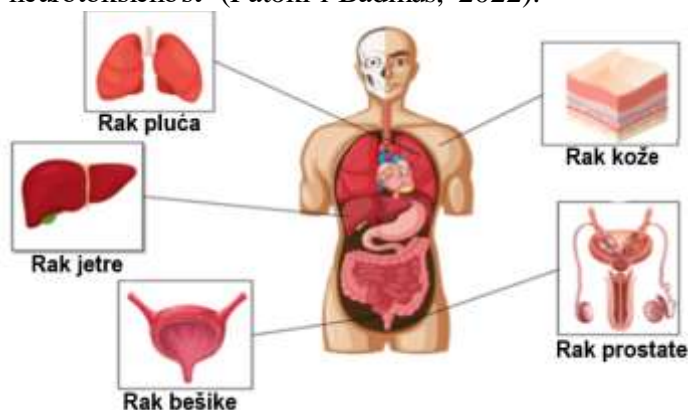
## 2.9. Toksični mikroelementi

Najzastupljeniji način izlaganja ljudi toksičnim mikroelementima potiče iz antropogenih izvora, poput sagorevanja uglja, naftne i farmaceutske industrije. Efekat toksičnih mikroelemenata na organizam umnogome zavisi od njihove biodostupnosti i oksidacionog potencijala. Toksični mikroelementi dovode do oksidativnog stresa, nepravilnog funkcionisanja imunskog sistema, epigenetskih promena i dr. Od suštinske je važnosti da se prati izlaganje ovim elementima u različitim biološkim materijalim (puna krv, serum/plazma, urin, kosa i dr.) kako bi se sprovele odgovarajuće mere opreza i time umanjili negativni uticaji na ljudsko zdravlje (Vorkamp i sar. 2021).

Izloženost niklu (Ni) najčešće potiče iz različitih antropogenih izvora, poput metalurgije, hemijske i prehrambene industrije (Genchi i sar. 2020). Usled prekomernog izlaganja Ni može doći do pojave kontaktnog dermatitisa, kardiovaskularnih problema, fibroze pluća i malignih tumora. Nikl može oštetiti mitohondrije tako što menja potencijal na mitohondrijskoj membrani. Takođe, primećeno je da može da snizi sadržaj

mitohondrijskog ATP-a i da utiče na degradaciju mitohondrijske DNK (Genchi i sar. 2020). Studije novijeg datuma ukazale su da primena supstanci poput L-karnitina, melatonina i taurina, koje stimulišu i pojačavaju aktivnost antioksidativnih enzima, može sprečiti neurotoksičnost i kancerogenost izazvanu Ni (Song i sar. 2017). Međunarodna agencija za ispitivanje malignih bolesti (engl. International Agency for Research on Cancer, IARC) klasifikovala je Ni u u grupu 2B potencijalnih humanih kancerogena, dok su jedinjenja Ni klasifikovana u prvu grupu humanih kancerogena. Bitno je naglasiti da se kancerogeni efekat Ni i njegovih jedinjenja odnosi pretežno na inhalatornu izloženost profesionalnog tipa (IARC 1990).

Toksični efekat arsena (As) na zdravlje umnogome zavisi od njegove vrste; organski oblici As nemaju jednaku toksičnost kao neorganski As(III) i As(V), koji su, prema IARC-u, klasifikovani u humane kancerogene prve grupe. Hemijska industrija, kožarska industrija i nekontrolisana upotreba poljoprivrednih đubriva su primarni antropogeni izvori As putem kojih dospeva u zemljište i podzemne vode (Fatoki i Badmus, 2022). Previsoke koncentracije ovog elementa u pijaćoj vodi predstavljaju javno-zdravstveni problem širom sveta, uključujući i Vojvodinu (Jovanović i sar. 2011). Prekomerni unos As iz pijaće vode dovodi do smanjene funkcije imunskog sistema, problema u funkcionisanju kardiovaskularnog sistema, malignoma kože, jetre, bešike i pluća (Slika 26). Takođe, sa prekomernim izlaganjem As povezani su i dijabetes tipa 2, kognitivne smetnje i neurotoksičnost (Fatoki i Badmus, 2022).

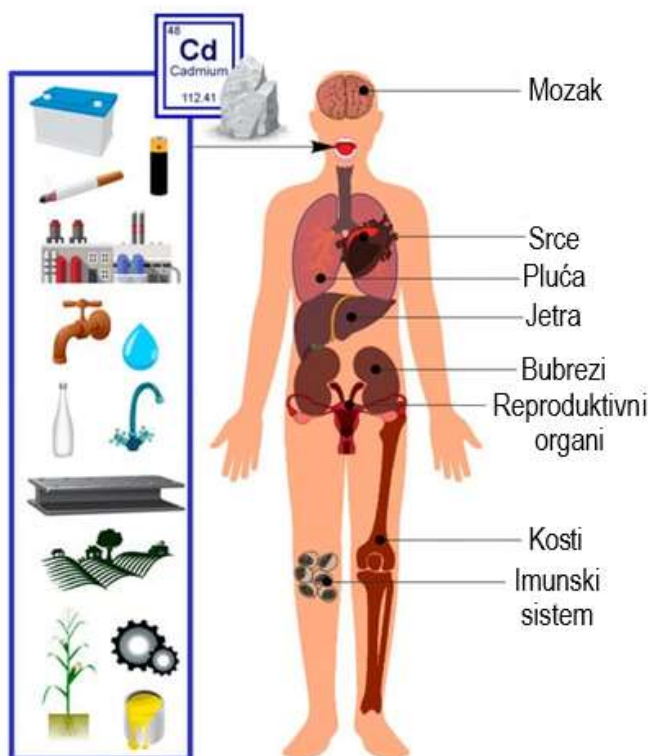


Slika 26. Uticaj As na zdravlje

Preuzeto: <https://brieflands.com/articles/healthscope-135108>

Kadmijum (Cd) ima široku primenu u industriji, od izrade baterija, pigmenata, metalnih premaza do izrade plastike. Najčešći uzroci dospevanja Cd u životnu sredinu prirodnim putem su šumski požari, vulkanske erupcije i padavine, dok na ljudsku izloženost, osim profesionalne izloženosti, najpre utiče konzumiranje duvana i kontaminirane hrane ili vode. Kadmijum se u krvotoku vezuje za proteine plazme, prvestveno za albumin, što za posledicu ima njegovu akumulaciju u jetri. Ukoliko se jave kompleksi sa molekulima manje mase, poput metalotioneina, reapsorbovaće se u bubrežnim tubulama. Pored bubrega i jetre, Cd ima tendenciju da se akumulira u plućima, pankreasu, adipoznom tkivu i koži (Slika 27). Takođe, Cd se u krvotoku vezuje za sulfhidrilne grupe određenih enzima, čime ih inaktivira, što za posledicu ima smanjenu sintezu hema (Charkiewicz i sar. 2023).





Slika 27. Uticaj Cd na zdravlje  
 Preuzeto: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/18/6620>

Po IARC-u, Cd je klasifikovan u prvu grupu humanih kancerogena. Izloženost Cd, bilo profesionalno ili iz životne sredine, dovedena je u vezu sa pojavom različitih oboljenja, poput renalne i hepatobilijarne disfunkcije, pojave osteomalacije ("itai-itai" oboljenje), malignoma pankreasa, mokraćne bešike, pluća, dojke, prostate i nazofarinksa (Genchi i sar. 2020) (Slika 27). Srednja vrednost koncentracije Cd u uzorcima pune krvi za našu odraslu populaciju iznosi  $0,46 \pm 0,41 \mu\text{g/kg}$  (Stojsavljević i sar. 2019).

Olovo (Pb) ima široko rasprostranjenu upotrebu u različitim tipovima industrija, od proizvodnje i reciklaže baterija, rudarstva, metalurgije do automobilske industrije (Wani i sar. 2015). Olovo se koristilo u proizvodnji benzina, dok nije zamenjeno metilciklopentadienilmangantrikarbonilom. Izloženost Pb doprinosi mnogobrojnim zdravstvenim posledicama, poput oštećenja bubrega i CNS, smetnji u razvoju i kognitivnim deficitima dece, pojavi anemije, smanjenju funkcije reproduktivnog i imunskog sistema. Uprkos brojnim naporima međunarodnih organizacija koje se bave javnim zdravljem, nije utvrđena najniža dozvoljena koncentracija Pb u krvi koja bi se mogla smatrati bezbednom (Wani i sar. 2015).



Slika 28. Uticaj Pb na zdravlje

Preuzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S277241662200050X>

Prema IARC-u, neorganska jedinjenja Pb svrstana su u grupu 2A humanih kancerogena, dok su organska jedinjenja Pb svrstana u grupu 3. Olovo ima tendenciju da se prvo akumulira u kostima i zubima (Slika 28), ali je radioizotopskim studijama utvrđeno da se akumulira i u mozgu, jetri, slezini, bubrezima i plućima. Novije studije su ukazale da Pb negativno utiče na funkciju enzima koji imaju ulogu u sintezi vitamina D. Takođe, uočeno je da Pb ometa transkripciju DNK (Wani i sar. 2015, Larsen i Sanchez-Triana, 2023). Srednja vrednost koncentracije Pb u punoj krvi naše odrasle populacije iznosi  $23,89 \pm 11,54 \mu\text{g/kg}$  (Stojsavljević i sar. 2019).

Torijum (Th) se koristio u radiologiji kao kontrastni agens u vidu jedinjenja torotrasta (Slika 29). Isključen je iz upotrebe nakon što je uočeno da se akumulira u slezini, jetri i limfnim čvorovima. Takođe, klasifikovan je od strane IARC-a u humane kancerogene prve grupe (van Kaick i sar. 1999).

Zabeležena je povećana učestalost oboljevanja od kancera pluća, pankreasa, jetre i kostiju kod osoba koje su bile izložene Th, pretežno u profesionalnom okruženju. Takođe, uočene su hromozomske aberacije kod osoba izloženih Th, što ukazuje na njegovu genotoksičnost. Danas se Th primenjuje u izradi goriva za nuklearne reaktore (van Kaick i sar. 1999). Srednja vrednost koncentracije Th u punoj krvi naše odrasle populacije iznosi  $0,44 \pm 0,38 \mu\text{g/kg}$  (Stojsavljević i sar. 2019).



Slika 29. Konvencionalna radiografija gornjeg abdomena pokazuje rezidualni kontrast Thorotrast u jetri (crvena strelica), po celoj slezini (bela strelica) i posebno gusto je raspoređen u limfnim čvorovima (crne strelice).

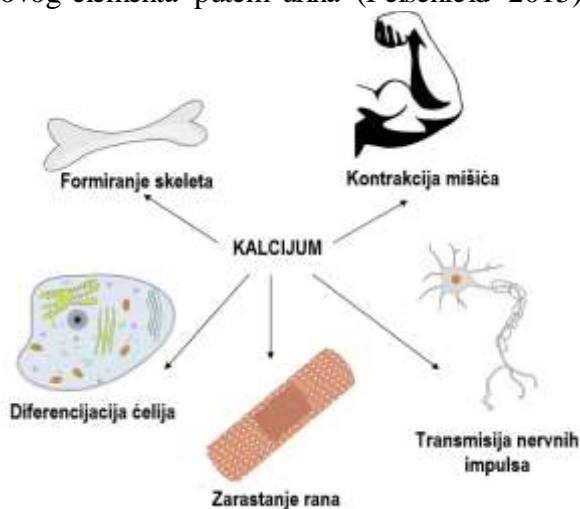
Preuzeto: <https://learningradiology.com/archives/COW%20015-Thorotrast/thoratrastcorrect.htm>

Uranijum (U) se najčešće akumulira u kostima, jetri, mozgu i bubrezima. IARC je svrstao ovaj element u grupu 1 humanih kancerogena (IARC 2000). Dokazi o kancerogenosti U i njegovih izotopa i jedinjenja su ograničeni i često kontradiktorni, iako je uočena povezanost između izlaganja ovom elementu i oštećenja bubrega i jetre, kao i pojave malignoma pluća i mozga. Takođe, uočene su više koncentracije U u krvi i određenim solidnim tkivima kod osoba koje su živele ili boravile na teritoriji gde je zloupotrebljen osiromašeni U u vidu municije (ATSDR 2013). U našoj odrasloj populaciji, koncentracije U u punoj krvi su  $0,06 \pm 0,04 \mu\text{g/kg}$ , što je iznad proseka koji je zabeležen u svetu (Stojsavljević i sar. 2019). Naime, podaci dobijeni analizom pune krvi za zdravu odraslu populaciju Francuske zabeležili su medijanu koncentracije U u vrednosti od  $0.004 \text{ ng/g}$  (Gouille i sar. 2006), dok su za populaciju Nemačke zabeležene srednje vrednosti koncentracije niže od  $0,003 \text{ ng/g}$  (Heitland i Köster, 2006).

## 2.10. Makroelementi

Kalcijum (Ca) je makroelement koji ima mnogobrojne uloge u organizmu, od formiranja oocita, koagulacije krvi, regulisanja krvnog pritiska i nervnih impulsa, kontrakcije mišića, diferencijacije ćelija do formiranja kostiju i zuba (Slika 30). Najveći procenat Ca u telu nalazi se u obliku hidroksiapatita u kostima (Pu i sar. 2016).

Koncentracija Ca u intracelularnoj i ekstracelularnoj tečnosti je strogo kontrolisana putem paratiroidnog hormona (PTH), vitamina D i kalcitonina, pri čemu se aktivnost PTH i vitamina D povećava usled snižene koncentracije Ca, dok se kalcitonin luči kada su koncentracije Ca povišene (Van Saun 2007). Paratiroidni hormon povećava koncentraciju Ca u krvi direktnim aktiviranjem reapsorpcije Ca u bubrezima i njegovog oslobađanja iz kostiju, dok vitamin D povećava reapsorpciju Ca iz creva i bubrega (Pu i sar. 2016). Kalcitonin snižava koncentraciju Ca u krvi, utičući na aktivnost osteoklasta i povećavajući izlučivanje ovog elementa putem urina (Felsenfeld 2015).



Slika 30. Uloge kalcijuma u organizmu

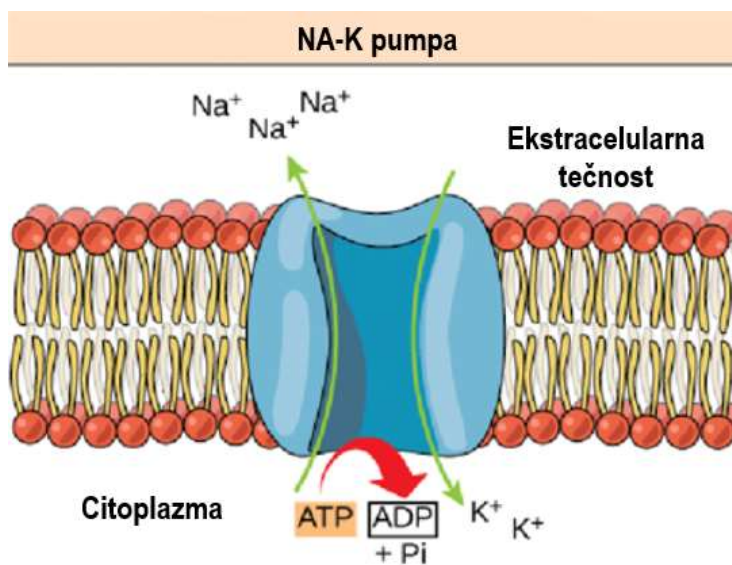
Izvor: <https://collegedunia.com/exams/biological-importance-of-calcium-and-magnesium-chemistry-articleid-5256>

Određena oboljenja mogu narušiti homeostazu Ca i dovesti do hiper- ili hipokalcemije. Hipokalcemija izaziva tremor i spazam mišića, a u težim slučajevima može izazvati stridor, osteopeniju i osteoporozu. S druge strane, hiperkalcemija može izazvati mučninu, umor, slabost mišića, poremećaj srčanog ritma do smrtonosnog, kao i krte kosti (Pu i sar. 2016).

Koncentracija natrijuma (Na) u intracelularnoj i ekstracelularnoj tečnosti je strogo kontrolisana pomoću natrijum-kalijum ATPazne pumpe (Slika 31), koja ima

ulogu u transportu jona Na i kalijuma (K) koristeći ATP. Apsorpcija Na se odigrava u distalnom delu tankog creva i u kolonu (debelom crevu), a njegova koncentracija u organizmu se reguliše u bubrezima. Glomeruli u bubrezima filtriraju Na, koji se reapsorbuje u proksimalnim tubulama u procentu koji zavisi od potreba organizma (od 0,5% do 10%). Angiotenzin II, aldosteron, noradrenalin i insulin imaju uticaj na reapsorpciju Na, dok dopamin i prostaglandini utiču na njegovo izlučivanje. Mali procenat Na se izlučuje putem znoja i fecesa (Strazzullo 2014).

Klinički relevantna deficijencija Na je izuzetno retka, s obzirom na to da se dovoljne količine Na unose putem hrane i pijaće vode. Deficijencija Na se može javiti kod osoba koje imaju oštećenje bubrega, insuficijenciju nadbubrežnih žlezda, dijareju, povraćanje i/ili dijabetesnu ketoacidozu (Strazzullo 2014).



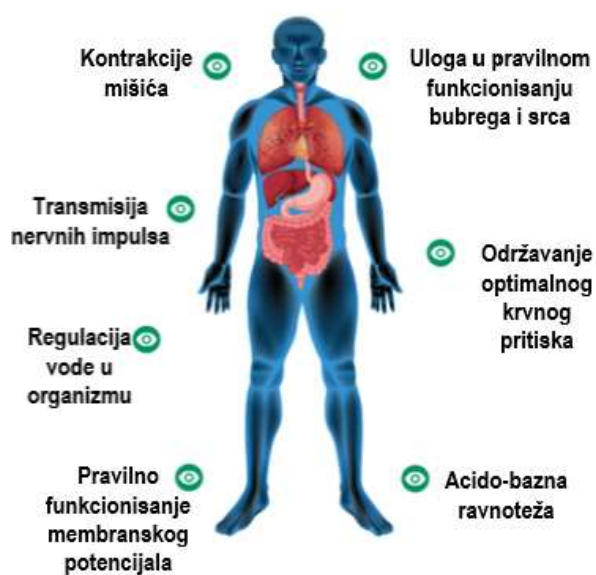
Slika 31. Natrijum-kalijum pumpa

Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/273751706\\_Malignant\\_hyperthermia\\_A\\_runaway\\_thermogenic\\_futile\\_cycle\\_at\\_the\\_sodium\\_channel\\_level/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/273751706_Malignant_hyperthermia_A_runaway_thermogenic_futile_cycle_at_the_sodium_channel_level/figures?lo=1)

Prekomeran unos Na putem ishrane (0,5-1g soli/kg telesne težine) izaziva akutnu toksičnost sa potencijalnim smrtnim ishodom. U određenim patološkim stanjima (npr. srčana insuficijencija, ciroza jetre i bubrežna insuficijencija), unos Na do nivoa koji je standardno prisutan u našoj ishrani ( $\geq 10$  g/dan) može dovesti do ozbiljnog povećanja zapremine ekstracelularne tečnosti (Strazzullo 2014).

Kalijum je uključen u održavanju acido-bazne ravnoteže organizma, pravilno funkcionisanje membranskog potencijala, mišića i nerava (Slika 32). Najveći procenat K koji se filtrira kroz bubrežne glomerule reapsorbuje se kroz bubrežne tubule. Ukoliko je ekstracelularna koncentracija K povišena, podstiče se oslobađanje aldosterona koji ima uticaj na izlučivanje K urinom. Deficijencija K je retka, jer se dovoljno K unosi putem ishrane i pijaće vode. Ukoliko se deficijencija K javi kod osoba sa bubrežnom ili adrenalnom insuficijencijom, može prouzrokovati hipomagnezemiju, probleme sa GIT-om i slabost mišića (Lanham-New i Lambert, 2012).

## KALIJUM

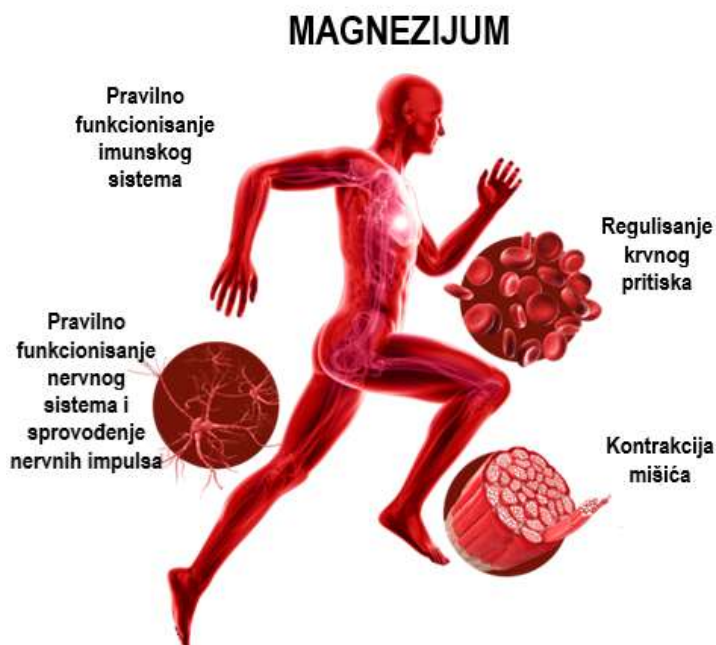


Slika 32. Uloge K u organizmu

Izvor: <https://fromgreens.com/galleryphoto/potassium-health-benefits/>

Magnezijum (Mg) ima ulogu u sintezi proteina, DNK i RNK, glikolizi, oksidativnoj fosforilaciji i kontrakciji mišića (Slika 33). Deficijencija Mg usled nedovoljnog unosa se retko javlja, s obzirom da bubrezi regulišu izlučivanje Mg u zavisnosti od njegove koncentracije u organizmu. Osobe koje imaju oboljenja GIT-a, poput Kronove bolesti ili osobe koje imaju dijabetes tipa 2 mogu imati deficijenciju Mg usled njegovog prekomernog izlučivanja (Rude 2012).

Simptomi koji opisuju nedovoljne koncentracije Mg u organizmu su grčevi u mišićima, srčane aritmije, a kao posledica deficijencije mogu da se jave hipokalemija i/ili hipokalcemija. Hipermağnezemija se može javiti kod osoba koje imaju bubrežnu insuficijenciju i može izazvati srčani udar, ukoliko su koncentracije Mg u krvotoku previsoke (Rude 2010; Rude 2012).



Slika 33. Uloge Mg u organizmu  
Izvor: <https://slowmag.co.za/physical-performance>

## 2.11. Metalomika

Metalomika je relativno nova naučna disciplina, koja obuhvata medicinu, toksikologiju, analitičku hemiju i biohemiju. Cilj metalomike jeste rasvetljavanje uloge metala/metaloida u metabolizmu, regulaciji biohemijskih procesa, etiologiji različitih oboljenja i dr. (Maret 2018). Takođe, cilj metalomike je da proširi i upotpuni nalaze drugih „omiks nauka“ poput proteomike i genomike.

Termin „metalomika“ prvi put je primenjen ranih 2000-tih da opiše različite načine i puteve distribucije elemenata u tragu koji imaju ulogu u funkcionisanju organizma. Od tada do danas, ova disciplina je napredovala i našla primenu u mnogim oblastima. Prednost metalomike je njen multidisciplinarni pristup, čime se prevazilazi jednodimenzionalnost pristupa postavljenoj hipotezi (Maret 2018).

Metalomika je našla primenu u proceni uticaja zagađujućih supstanci na životnu sredinu. Naime, analizom distribucije i koncentracije metala/metaloida u vodi, zemljištu, kao i biljkama i životinjama, moguće je proceniti stepen zagađenja i negativnog uticaja na životnu sredinu i biodiverzitet. Analize metala/metaloida mogu doprineti razvoju odgovarajućih strategija za uklanjanje kontaminacije iz životne sredine putem bioremedijacije. Razumevanje načina na koji mikrobi i biljke stupaju u interakciju sa metalima može dovesti do efikasnijih metoda za uklanjanje ili stabilizaciju zagađujućih supstanci u životnoj sredini (Maret 2018).

Takođe, češća primena metalomike podrazumeva kvantifikaciju metala/metaloida u cilju boljeg razumevanja zdravlja. Metalomika se koristi za identifikaciju elemenata koji mogu imati uticaj na nastanak određenih oboljenja, poput kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, reproduktivnih oboljenja kao i različitih tipova kancera i karcinoma. Bitno je istaći da metalomske analize mogu imati ulogu i u razvoju terapija, tako što se rasvetljavaju uloge detektovanih elemenata u nastanku oboljenja. Takođe, metalomika može pružiti uvid u to kako lekovi na bazi metala reaguju sa biološkim sistemima i mogu pomoći u dizajniranju efikasnijih i sigurnijih tretmana. Metalomika može da razjasni ulogu esencijalnih metala u tragovima u ishrani i metabolizmu. Pomaže u razumevanju kako nedostaci ili višak metala utiču na zdravlje i može uticati u osmišljavanju dijetetskih intervencija za ispravljanje deficijencija ili suficijencija (Maret 2018).

Analiza elemenata u kliničkim uzorcima je važna zbog praćenja izlaganja i sprečavanja potencijalnih zdravstvenih posledica. Klinički uzorci koji se najčešće koriste za ove svrhe su keratinska tkiva (kosa i nokti), serum/plazma, puna krv i urin. Keratinska tkiva su najlakše dostupna za metalomsku analizu zbog činjenice da nije neophodno pristupiti invazivnim metodama prikupljanja. Iako keratinska tkiva mogu ukazati na dugoročno izlaganje elementima, ona su podložna eksternoj kontaminaciji i rezultate dobijene analizom ovih uzoraka treba uzeti sa rezervom tokom razmatranja. Pouzdanije je pristupiti analizi urina, seruma/plazme ili pune krvi. S druge strane, puna krv pruža dublji uvid u dugotrajnu izloženost zahvaljujući životnom ciklusu eritrocita u cirkulaciji, koji traje do tri meseca. Najbolji izbor uzorka za procenu statusa elemenata u organizmu su solidna tkiva poput tiroidnog, placentalnog, moždanog i drugih tkiva, zbog tendencije elemenata da se akumuliraju u organima tokom godina. Analiziranje čvrstih tkiva nosi sa sobom izazove zbog invazivnog pristupa uzimanja uzoraka, koji zahteva operacije, biopsije ili obdukcije (Stojsavjević i sar. 2021; Heitland i Köster, 2021).

U cilju dobijanja što preciznijih i tačnijih rezultata, metalomska istraživanja moraju da poseduje nove analitičke tehnike za detekciju i kvantifikaciju elemenata od interesa. Trenutni eksperimentalni pristupi u metalomici uključuju kombinovanje tehnika razdvajanja visoke rezolucije (kao što su HPLC i gel elektroforeza) sa osetljivim metodama detekcije (kao što je masena spektrometrija). Masena spektrometrija

induktivno spregnute plazme (ICP-MS) se široko koristi, često uparena sa tehnikama odvajanja. Pored toga, nuklearne analitičke tehnike, kao što su analiza neutronske aktivacije i rendgenska fluorescencija sinhrotronskog zračenja (KSRF), se često primenjuju u identifikaciji metaloproteina. Računarska bioinformatika takođe može predvideti proteine koji se vezuju za metal na osnovu poznatih obrazaca i domena, dopunjujući eksperimentalne metode. Ovi integrisani pristupi poboljšavaju razumevanje metaloma i njihove uloge u zdravlju (Hu i sar. 2012).

## **2.12. Analitičke tehnike zasnovane na induktivno spregnutoj plazmi**

Analitičke tehnike zasnovane na induktivno spregnutoj plazmi (engl. inductively coupled plasma, ICP) imaju široku primenu u određivanju koncentracije elemenata u različitim tipovima uzoraka, uključujući i kliničke. Odlikuju se visokom tačnošću, preciznošću, širokim linearnim dinamičkim opsegom, multielementalnošću i niskim granicama detekcije, što ih čini pogodnim tehnikama za određivanje elemenata u tragu i ultra-tragu. Induktivno spregnuta plazma ima dovoljnu temperaturu za disocijaciju, atomizaciju, jonizaciju i ekscitaciju velikog broja elemenata. Granica detekcije ovih tehnika u velikom procentu zavisi od standardne devijacije pozadinskog signala i pozadinske ekvivalentne koncentracije (engl. background equivalent concentration, BEC). Tehnike koje imaju najveću primenu u analizi različitih kliničkih uzoraka su indukivano spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) i indukivano spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom (engl. inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, ICP-OES). Način pripreme uzorka za analizu, princip uvođenje uzorka u plazmu i princip generisanja plazme identičan je kod obe ICP tehnike (Harrington i sar. 2014; Topdag i sar. 2020; Toket i sar. 2019; Chen i sar. 2020).

### **2.12.1. Priprema uzoraka za analizu**

Priprema uzoraka je ključni deo u elementalnoj analizi i zahteva posebnu pažnju. Ukoliko su uzorci lakšeg matriksa, poput tečnih kliničkih uzoraka (seruma, plazme, seminalne plazme, urina, likvora, sinovijalne, folikularne i drugih tečnosti), uzorak je dovoljno razblažiti odgovarajućom smešom rastvarača uz adekvatan dodatak internog standarda pre određivanja elementalnog sastava (Harrington i sar. 2014; Toket i sar. 2019; Chen i sar. 2020).

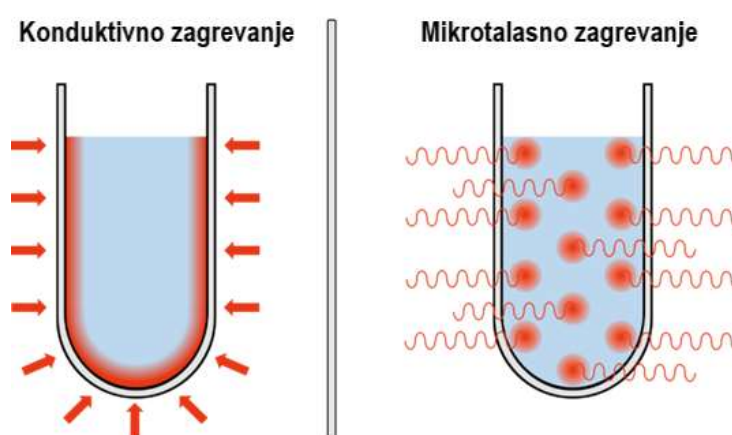
Uzorke solidnih tkiva i pune krvi je neophodno razoriti, što se najčešće postiže kombinacijom koncentrovane azotne kiseline (65%  $\text{HNO}_3$ ) i vodonik-peroksida (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Kombinacija ova dva reagensa pokazala se najboljim izborom, jer se elementi prevode u rastvoran oblik i organska supstanca se potpuno razara. Azotna kiselina, za razliku od kiselina poput sumporne ili hlorne, ne daje teško rastvorne soli elemenata, dok vodonik-peroksid služi da ubrza proces razaranja organskog matriksa (Topdag i sar. 2020; Toket i sar. 2019; Chen i sar. 2020).

Princip razaranja kliničkih uzoraka obuhvata spaljivanje, mokru digestiju u otvorenim ili zatvorenim sistemima. Od pomenutih mogućnosti, spaljivanje je najmanje pouzdana opcija, zbog potencijalne kontaminacije kliničkog uzorka i gubitaka isparljivih elemenata. Mokra digestija u otvorenim sistemima podrazumeva razaranje uzorka na atmosferskom pritisku uz zagrevanje na grejnom telu. Razaranje uzorka je ograničeno na temperaturu ključanja kiseline koja se koristi, što usporava vreme razaranja i produžava pripremu uzoraka za analizu. Takođe, javlja se mogućnost gubitka analita usled isparavanja reagensa i kontaminacije uzorka (Harrington i sar. 2014; Chen i sar. 2020).

Najbolja metoda za razaranje kliničkih uzoraka je mikrotalasna digestija (Slika 34). Digestija u zatvorenom sistemu povećava kinetiku reakcije i temperaturu razaranja,



što drastično smanjuje vreme pripreme uzorka. Povećavanje temperature tokom digestije je rezultat mikrotalasne interakcije sa dipolarnim molekulima i jonima u uzorku. Mikrotalasi povećavaju energiju jona, što izaziva njihovo češće sudaranje sa okolnim molekulima i utiče na porast molekulske rotacije dipola. Princip primene mikrotalasa rezultira ravnomernim zagrevanjem čitavog suda u kojem se reakcija odigrava. Temperatura i pritisak su dva parametra koja se konstantno prate tokom procesa digestije, u cilju adekvatnog regulisanja snage aparata (Welna i sar. 2011; Matusiewicz i sar. 2003). Cilj mikrotalasne digestije jeste potpuno razaranje uzoraka uz sprečavanje gubitka analita i kontaminacije prilikom rada u zatvorenom sistemu, pri čemu se pored vodonik-peroksida koriste koncentrovane kiseline, poput azotne, sumporne, fluorovodonične i hlorovodonične (Welna i sar. 2011; Matusiewicz i sar. 2003).



Slika 34. Princip mikrotalasne digestije

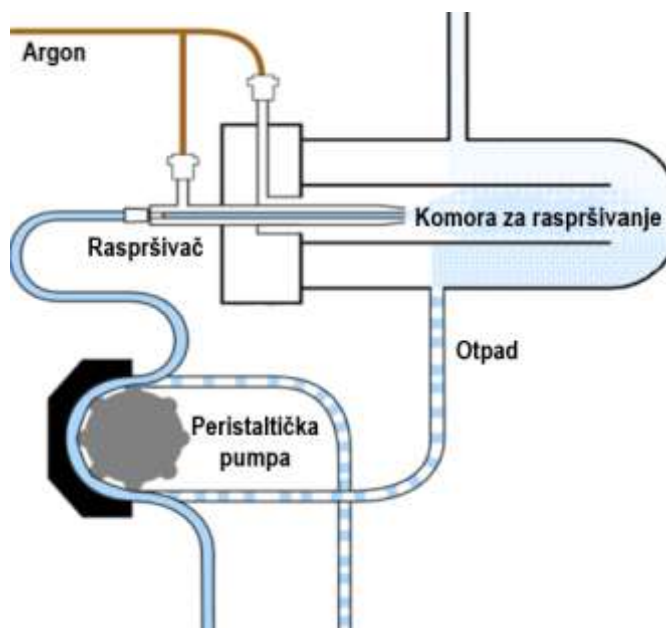
Preuzeto: <https://cem.com/microwave-heating-mechanism-and-theory>

Zbog korišćenja agresivnih reagenasa, kao i zbog povećanja pritiska i temperature tokom digestije, neophodno je da kivete u kojima se odigravaju reakcije budu hemijski inertne i propusne za mikrotalase. To se postiže upotrebom kiveta od politetrafluoroetilena (PTFE) koje su stabilne na temperaturama do 260 °C i pritisku do 200 bara i imaju izuzetnu mehaničku stabilnost i otpornost na isparenja koja nastaju usled reakcije razaranja. Gasovi koji nastaju razaranjem organske supstance se pogodnim sistemom ventilacije odvođe iz kiveta (Welna i sar. 2011; Matusiewicz i sar. 2003).

### 2.12.2. Način uvođenja uzorka i princip formiranja induktivno kuplovane plazme

Pripremljen (tečan) uzorak se uvodi u raspršivač i komoru za raspršivanje cevčicom koja je zategnuta preko kanala minirolera na peristaltičkoj pumpi (Slika 35). Ujedno se može uvoditi rastvor internog standarda preko nezavisnog kanala na istoj pumpi. Komora za raspršivanje ima ulogu u selektovanju kapljica određenih dimenzija (ispod 10 μm) ka plazmi, dok se kapljice veće od 10 μm odvođe u otpad. Veliki deo uzorka (95-98%) se ne uvede u plazmu, već završava u otpadu (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

Temperatura komore za raspršivanje kod ICP-MS tehnike se mora regulisati (hladiti), kako bi se održavale performanse instrumenta i adekvatna selekcija kapljica. Takođe, na taj način se sprečava prekomerno unošenje rastvarača u plazmu i stvaranje vrsta koje mogu značajno da smanje odziv instrumenta (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

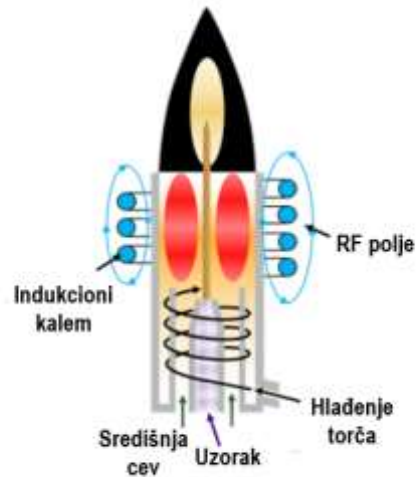


Slika 35. Prikaz sistema za uvođenje uzorka u plazmu

Izvor: [http://people.whitman.edu/~dunnivfm/FAASICPMS\\_Ebook/CH3/3\\_3\\_2.html](http://people.whitman.edu/~dunnivfm/FAASICPMS_Ebook/CH3/3_3_2.html)

Plazma je visokojonizovani gas. Sastoji se od elektrona, jona, atoma i u celini je elektroneutralna. Za generisanje plazme najčešće se koristi argon. Ovaj plemeniti gas ima jednostavan emisioni spektar, može da jonizuje, pobudi ili atomizuje veliki broj elemenata periodnog sistema i ne formira stabilna jedinjenja sa drugim elementima. Takođe, kao plemeniti gas, on je monoizotopski, hemijski je inertan i ima visoku energiju jonizacije (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

Plazma nastaje u delu instrumenta, torču(plameniku), koji se sastoji od tri koncentrične kvarcne cevi kroz koje protiče argon (Slika 36). Spoljašnja kvarcna cev ima ulogu u hlađenju torča, središnja u formiranju plazme, a unutrašnja nosi aerosol uzorka. Kraj torča ima oko sebe obmotan indukcioni kalem sačinjen od Cu koji je povezan sa radiofrekventnim (RF) generatorom. Radiofrekventni generator ima ulogu u napajanju Cu kalema, što rezultira naizmeničnom visokofrekventnom strujom koja generiše elektromagnetno polje u torču. Primenom visokonaponskog pražnjenja „Tesline varnice“ dolazi do jonizacije argona u torču, čime se generišu joni i elektroni. Nastali proizvodi visokonaponskog pražnjenja kreću se pod uticajem elektromagnetnog polja i sudaraju se sa atomima argona pri čemu nastaju novi joni i elektroni (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008). Krajnji rezultat ovog kaskadnog procesa jeste generisanje plazme visoke temperature koja iznosi 10.000 Kelvina (9727 °C) (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

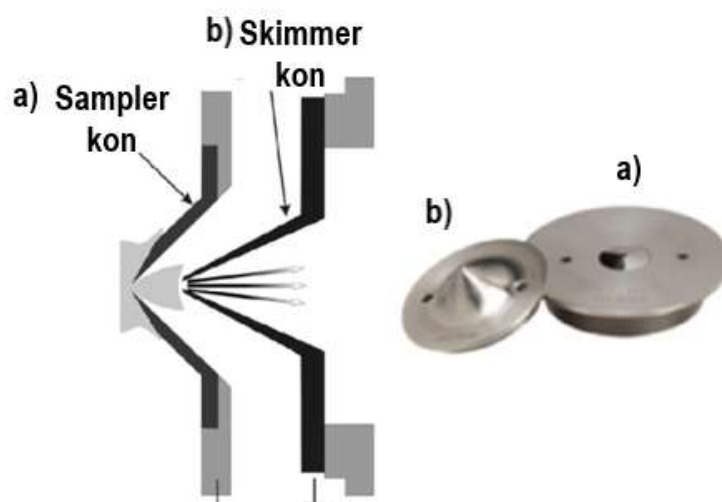


Slika 36. Prikaz torča (plamenika)

Izvor: <https://www.thermofisher.com/rs/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/trace-elemental-analysis-tea-information/icp-oes-information/icp-oes-system-technologies.html>

Nakon uvođenja uzorka u plazmu ICP-MS instrumenta, uzorak se jonizuje, pri čemu veliki broj elemenata kao proizvod daje jednostruko naelekisane jone. Stepenn same jonizacije umnogome zavisi od temperature plazme i jonizacionog potencijala elemenata od interesa. Većina elemenata periodnog sistema ima jonizacioni potencijal koji je manji od argonovog, što omogućava kvantifikaciju velikog broja elemenata primenom ICP-MS tehnike. Osetljivost instrumenta osim jonizacione energije zavisi i od zastuljenosti izotopa koji se određuje (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

Jonizovani uzorak putuje dalje ka interfejs regionu, odeljku pod vakuumom, koji čine dva kona koja mogu biti sačinjena od Ni ili platine. Prvi kon, *sampler* kon, ima veći otvor od *skimmer* kona (Slika 37). Uloga interfejs regiona jeste da razdvoji nastale jone, fotone i atome od plazme i da ih usmeri dalje ka jonskoj optici (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).



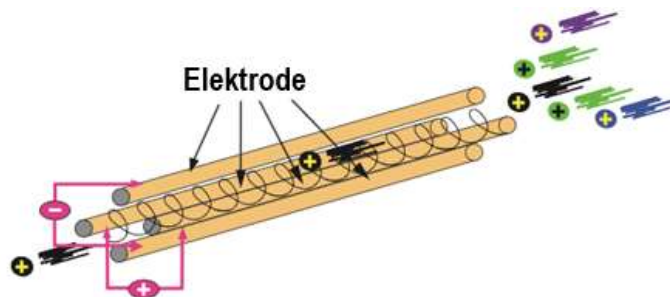
Slika 37. Interfejs region

Izvor: <https://www.semanticscholar.org/paper/Computational-study-of-inductively-coupled-plasma-Aghaei/3bc7c1660798852f689d797a9701ecee297053cc>

Jonsku optiku čine elektrostatička sočiva. Uloga jonske optike je da usmerava snop jona ka masenom analizatoru i da spreči vrste, poput fotona, da dođu do detektora.

U ICP-MS tehnici, fotoni su neželjena vrsta, jer izazivaju nestabilnost signala (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

Postoji nekoliko vrsta masenih analizatora, kvadrupol, TOF (engl. „time of flight“), magnetni sektor i drugi, od kojih se u ICP-MS instrumentima najčešće koristi kvadrupol. Kvadrupol ima ulogu u filtriranju jona u odnosu na njihov odnos  $m/z$  (masa / naelektrisanje) (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).



Slika 38: Prikaz kvadrupola

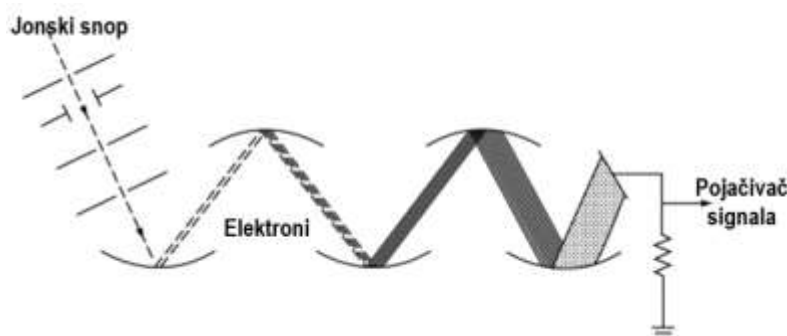
Izvor: <https://www.spectroscopyonline.com/view/impact-of-measurement-protocol-on-icp-ms-data-quality-objectives-part-i>

Kvadrupol čine četiri naelektrisane elektrode (Slika 38), od kojih su dvije naelektrisane pozitivno, a druge dvije negativno. Princip rada kvadrupola podrazumeva propuštanja jednosmerne i naizmenične struje kroz elektrode, što stvara električno polje između njih (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

Uspostavljanjem specifične kombinacije potencijala ove dve struje rezultira stabilnim putanjama jona sa tačno određenim  $m/z$  odnosom. Jona sa nestabilnim putanjama se sudaraju sa elektrodama i ne prenose se kroz kvadrupol. Naponi jednosmere i neizmenične struje mogu se menjati velikom brzinom, omogućavajući skeniranje čitavog opsega mase u vremenskom opsegu od par milisekundi. Velika brzina skeniranja modernih instrumenata omogućava prikupljanje podataka za više elemenata praktično istovremeno, što daje ICP-MS tehnici veliku prednost u odnosu na druge elementarne analitičke tehnike (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).

Najčešći detektor koji se koristi za ICP-MS je multiplikator elektrona (Slika 39), čiji se rad zasniva na pojačavanju signala pristiglog iz kvadrupola. Jona analita udaraju u dinode detektora, sa čije se površine oslobađaju elektroni. Oslobođeni elektroni udaraju u narednu dinodu, sa koje će se osloboditi veći broj elektrona. Reakcija je kaskadna, izazivajući kao krajnji rezultat merljivi signal (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008)..

Granice detekcije za ICP-MS su izuzetno niske, ppb čak i ppt, a osetljivost zavisi od prirode ispitivanog elementa, matriksa uzorka, faktora razblaženja i prirode rastvarača (Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).



Slika 39. Princip elektronmultiplikatora

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/electron-multiplier>

### **2.12.3. Kalibracija**

Eksterna kalibracija je najčešće primenjivan oblik kalibracije u ICP tehnikama. Podrazumeva pripremanje standardne serije rastvora koji sadrže tačno poznate koncentracije elemenata od interesa, koji služe za konstruisanje kalibracione krive elementa. Formirana kalibraciona kriva ima ulogu u tačnom određivanju koncentracije elemenata od interesa u ispitivanom uzorku (Wilschefski i Baxter. 2019).

### **2.12.4. Interna standardizacija**

Interna standardizacija se najčešće primenjuje u cilju poboljšanja signala instrumenta koji može da opadne usled efekata matiksa. Interni standard se uvek dodaje u tačno poznatoj zapremini u svaki standard, uzorak i slepu probu. Idealan interni standard treba da ima slična hemijska i fizička svojsva kao određivani elementi, da bude nezavisan od prirode ispitivanog uzorka i da na njega ne utiču fluktuacije instrumenta. Takođe, bitno je da interni standard ima sličnu masu i jonizacioni potencijal kao elementi od interesa. Interni standardi koji se obično koriste u ICP-MS uključuju litijum ( $^6\text{Li}$ ), skandijum ( $^{45}\text{Sc}$ ), germanijum ( $^{72}\text{Ge}$ ), itrijum ( $^{89}\text{I}$ ), rodijum ( $^{103}\text{Rh}$ ), indijum ( $^{115}\text{In}$ ), terbijum ( $^{159}\text{Tb}$ ), renijum ( $^{185}\text{Re}$ ) i iridijum ( $^{191}\text{Ir}$ ). Često se primenjuje kombinacija nekoliko internih standarda koji pokrivaju širok opseg analitičke mase. Neophodno je istaći da interni standardi koji se koriste ne budu prirodno zastupljeni u značajnim koncentracijama u kliničkim uzorcima. Međutim, upotreba internih standarda može dovesti do nedovoljno preciznih merenja ukoliko se matiks uzorka i standarda ne podudaraju. Jedan od načina da se to spreči jeste da se standardi pripremaju tako da im matiks bude što sličniji uzorku (Wilschefski i Baxter. 2019).

### **2.12.5. Metoda standardnog dodatka i razblaživanje izotopa**

Metoda standardnog dodatka se takođe često koristi u cilju dobijanja što tačnijih i preciznijih rezultata. Ova metoda podrazumeva dodavanje tačno poznatih zapremina analita u nekoliko alikvota uzorka i pokazala se odličnom u eliminisanju efekata matiksa (Wilschefski i Baxter. 2019; Andersen 2017).

Razblaživanje izotopa je metoda koja se pokazala najboljom u eliminisanju efekata matiksa i promena u radu instrumenta. Podrazumeva dodavanje poznate zapremine nekog izotopa željenog analita u uzorke, a izmerena promena u izotopskom odnosu se koristi za izračunavanje originalnog sastava uzorka. Obogaćeni izotop ima ulogu istovremeno kao kalibracioni i kao interni standard. Neophodno je istaći da analit od interesa mora imati najmanje dva izotopa koji ne predstavljaju spektroskopske smetnje jedan drugom. Takođe, ova metoda nije primenljiva na monoizotopske analite. Pored svoje izuzetne preciznosti i robustnosti, ova tehnika se ne koristi često, jer je vremenski i finansijski zahtevna (Wilschefski i Baxter. 2019).

### **2.12.6. Interferencije**

Prilikom određivanja elemenata od interesa primenom ICP tehnika, mogu se javiti određene smetnje (interferencije) koje značajno utiču na tačnost i preciznost dobijenih rezultata. Smetnje se klasifikuju kao spektroskopske i nespektroskopske. Spektroskopska interferencija nastaje kada joni koji nisu analiti od interesa imaju isti  $m/z$  odnos kao analit, dok se nespektroskopska interferenca odnosi na efekte koji se mogu pripisati matrisku uzorka ili promenama u uslovima rada instrumenta (Wilschefski i Baxter. 2019).

U spektroskopske smetnje svrstavaju se izobarične smetnje, dvostruko naelektrisani joni, poliatomske smetnje i preklapanje susednih masa (Wilschefski i Baxter. 2019; Pupyshew i Semenova 2001).

Izobarične smetnje podrazumevaju da dva elementa imaju istu masu, kao što su  $^{115}\text{Sn}/^{115}\text{In}$ ,  $^{87}\text{Rb}/^{87}\text{Sr}$ ,  $^{40}\text{Ca}/^{40}\text{Ar}$ ,  $^{58}\text{Fe}/^{58}\text{Ni}$  i drugi. Koliko će data smetnja uticati na tačnost i preciznost rezultata zavisi od prirode uzorka. Ukoliko je analit od interesa zastupljen u visokim koncentracijama u uzorku, a smetnja iste mase zastupljena zamenarljivo malo, izobarična smetnja neće predstavljati značajan problem (Wilschefski i Baxter. 2019; Pupyshew i Semenova 2001).

Elementi koji mogu da imaju dvostruko naelektrisane jone, poput Ca, lantanoida, aktinoida, mogu predstavljati smetnje, jer maseni spektrometar ne razlikuje naelektrisanja, već samo  $m/z$  odnose. Bitno je napomenuti da ovakve interferencije retko predstavljaju značajnu smetnju kod ICP tehnika (Wilschefski i Baxter. 2019).

Najzastupljenija i svakako najproblematičnija smetnja kod ICP tehnika je poliatomna smetnja. Poliatomne smetnje se formiraju u plazmi, usled nepotpune atomizacije ili usled rekombinantnih reakcija tokom prolaska jona ka masenom spektrometru. One mogu voditi poreklo od argona kao gasa nosača, od matriksa uzorka i reagenasa koji su se koristili za pripremu uzoraka. Poznata poliatomna smetnja koja se javlja kod uzoraka koji sadrže visoki sadržaj jona hlora je  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ . Ova smetnja ima isti  $m/z$  odnos kao arsen ( $^{75}\text{As}^+$ ), što utiče na tačnost i preciznost rezultata za ovaj element u tragu. Poliatomne smetnje mogu nastati i od reagenasa koji se koriste za pripremu uzoraka za analizu. Smetnje nastale ovim putem mogu se izbeći jednostavnim odabirom alternativnog reagensa za pripremu uzorka (Wilschefski i Baxter. 2019).

Često zanemaren izvor spektroskopskih smetnji u ICP-MS je onaj koji proizilazi iz spektralnog preklapanja susednih masa. Koliko će data smetnja uticati na rezultate zavisi od osetljivosti masenog analizatora na te izotope. Poznata smetnja je za mangan ( $^{55}\text{Mn}$ ) i gvožđe ( $^{54}\text{Fe}$  i  $^{56}\text{Fe}$ ). Ukoliko je gvožđe zastupljenije u uzorku koji se analizira, rezultati mogu ukazati na snižen sadržaj Mn u odnosu na stvarnu vrednost (Wilschefski i Baxter. 2019; Vanhoe et al. 1994).

nNespektroskopske smetnje podrazumevaju efekte matriksa i promene u radu i uslovima instrumenta. Efekti matriksa podrazumevaju pojačanje ili smanjivanje signala elemenata od interesa usled sastava ili prirode ispitivanih uzoraka. Efekti matriksa mogu da igraju ulogu već od sistema za uvođenje uzorka ka plazmi, gde viskozitet uzorka, površinski napon, kiselost i veličina kapljica aerosola igraju važnu ulogu. Kod analize tečnih kliničkih uzoraka najčešći problem je viskoznost, koja se veoma lako može izbeći adekvatnim razblaženjem analiziranih uzoraka (Wilschefski i Baxter. 2019; Loula et al. 2019).

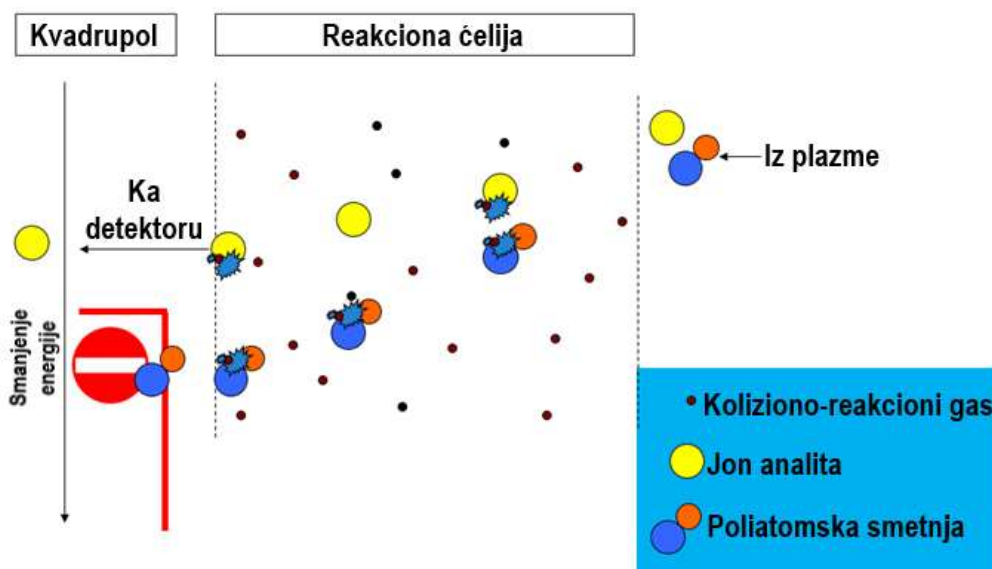
Brojni faktori mogu uticati na jonizaciju analita u plazmi. Relativno visoki nivoi lako jonizujućih elemenata u uzorku kao što su natrijum i kalijum imaju tendenciju da pomere ravnotežu termičke jonizacije analita prema neutralnom atomu, dok prisustvo ugljenika u uzorku ima suprotan efekat, povećavajući jonizaciju analita za elemente sa visokim jonizacionim potencijalom (Wilschefski i Baxter. 2019).

Najznačajniji izvor efekta matriksa u ICP-MS je efekat prostornog naboja koji se javlja u interfejs regionu i jonskoj optici, usled odbijanja pozitivno naelektrisanih jona, što kao krajnji rezultat ima smanjenje prenosa signala do detektora. Ovaj efekat umnogome zavisi od mase analita, jer analiti manje mase imaju nižu kinetičku energiju, pa samim tim i manju inerciju i stoga na njih ovaj efekat jače deluje u odnosu na elemente veće mase (Wilschefski i Baxter. 2019).

### 2.12.7. Uklanjanje smetnji

Izuzetno jednostavan i lak način za izbegavanje spektroskopskih smetnji jeste odabir izotopa elemenata od interesa koji imaju najmanje interferenci. Naravno, bitno je obratiti pažnju i na zastupljenost izotopa koji se bira, jer izotopi koji su nisko zastupljeni neće pružiti dovoljno preciznu informaciju o sadržaju elementa od interesa. Smetnje se takođe mogu umanjiti propuštanjem helijuma kroz kolizionu ćeliju (engl. kinetic

energy discrimination, KED mod) (Slika 40). Helijum se, kao gas male mase i visoke kinetičke energije, sudara sa poliatomnim smetnjama, pri čemu one gube na svojoj kinetičkoj energiji i ne stižu do detektora. Joni analita se takođe sudaraju sa helijumom, ali u manjoj meri. To se može objasniti većim poprečnim presekom poliatomne smetnje (Yamada 2015; Wilschefski i Baxter. 2019).



Slika 40. Princip koliziono-reakcione ćelije

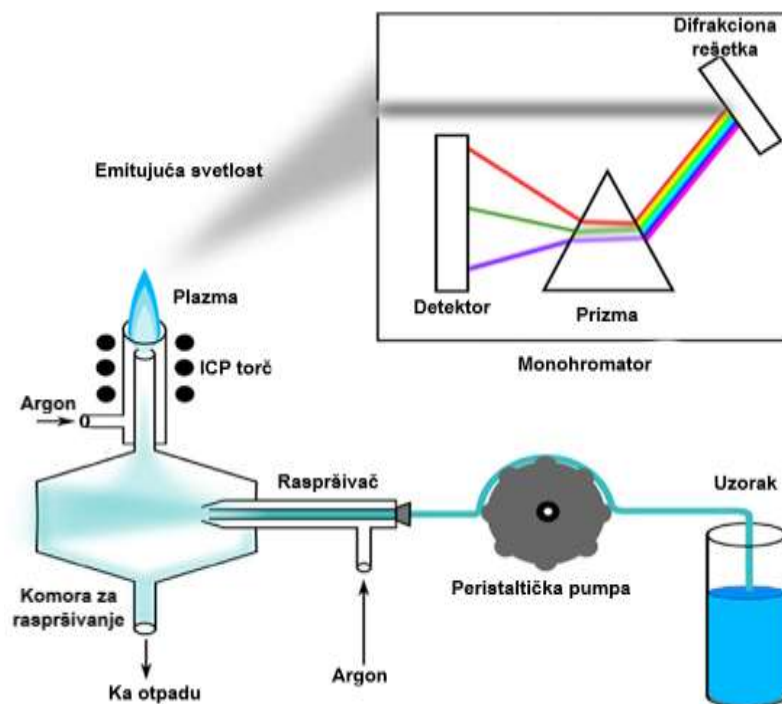
Izvor: <https://www.thermofisher.com/blog/analyteguru/how-to-improve-your-icp-ms-analysis-part-2-interferences/>

Pored helijuma, koji se najčešće primenjuje, umesto kolizone ćelije se može koristiti reakcioni mod/režim rada reakcione ćelije, kroz koju se propušta reaktivni gas poput amonijaka, metana, vodonika, kiseonika, azot-suboksida i drugih. Nedostatak reaktivnih gasova je njihova nespecifičnost i nemogućnost da eliminišu sve poliatomne smetnje (Yamada 2015; Wilschefski i Baxter. 2019).

Za uklanjanje nespektroskopskih interferenci mogu da posluže neke od već pomenutih metoda, poput metode standardnog dodatka, razblaživanje izotopa i interna standardizacija. Pored njih, koristi se i razblaživanje uzorka, kojim se smanjuje mogućnost nastanka taloga u raspršivaču i interfejs regionu. Osim nabrojanih metoda, primenjuju se i precipitacija, ekstrakcija sa čvrste faze, tečno-tečna ekstrakcija, generisanje hidrida. Poslednja od navedenih metoda zasniva se na generisanju isparljivih hidrida elemenata poput arsena, žive, selena, kalaja, antimona pomoću borhidridnog reagensa. Pored toga što se primenom ove metode odvaja analit od interesa od matriksa uzorka (čime se smanjuju i spektroskopske i nespektroskopske interferencije), ova metoda takođe obezbeđuje pojačanu osetljivost (Wilschefski i Baxter, 2019).

### 2.12.8. ICP-OES

ICP-OES je analitička tehnika koju karakterišu multielementalnost, visoka tačnost i preciznost, niske granice detekcije i robustnost (Hou i sar. 2016; Man i sar. 2017).



Slika 41. Šema ICP-OES uređaja

Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/320140448\\_On-Line\\_Inductively\\_Coupled\\_Plasma\\_Spectrometry\\_in\\_Electrochemistry\\_Basic\\_Principles\\_and\\_Applications/figures?lo=1&utm\\_source=google&utm\\_medium=organic](https://www.researchgate.net/publication/320140448_On-Line_Inductively_Coupled_Plasma_Spectrometry_in_Electrochemistry_Basic_Principles_and_Applications/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic)

ICP-OES (Slika 41), za razliku od ICP-MS tehnike koja kvantifikuje  $M^+$  jone, meri atomske i jonske linije elemenata od interesa. Kod ICP-OES tehnike joni i atomi bivaju pobuđeni u plazmi i pri vraćanju u svoje osnovno energetske stanje emituju fotone, koji se mere pomoću optičkog spektrometra. Da li će se za određivane elemente selektovati jonske ili atomske linije isključivo zavisi od toga koje su linije osjetljivije i kod kojih nisu prisutne (ili su minimalno prisutne) interferencije. Odlika ICP-OES tehnike su izuzetno bogati spektri koji se dobijaju za selektovane elemente, na šta ukazuje činjenica da bi se za 70 elemenata dobilo najmanje 70 000 emisionih linija, u opsegu talasne dužine od 200 nm do 600 nm (Hou i sar. 2016; Man .i sar. 2017).

Kako bi se izbegla preklapanja linija i obezbedile najbolje moguće performanse instrumenta, neophodno je da instrument poseduje detektor visoke rezolucije, koji će uspešno razdvojiti sve željene atomske i/ili jonske linije (Hou i sar. 2016; Man .i sar. 2017).

Iako svaki pojedinačni element apsorbuje i emituje svetlost na karakterističnoj talasnoj dužini, signali elemenata se često preklapaju, što može da dovede do značajnih izazova u tumačenju dobijenih rezultata. Da bi se rešio ovaj problem, talasne dužine koje odgovaraju svakom elementu se odvajaju, tako da se svaki element može pojedinačno detektovati. Postavljanje plazme u aksijalnu konfiguraciju (gde se plazma posmatra direktno) ili radialnu konfiguraciju (gde se plazma posmatra sa strane) ima dodatne pogodnosti na mogućnost posmatranja ciljnih signala (Hou i sar. 2016; Man .i sar. 2017).

Jedna od osnovnih razlika između ICP-OES i ICP-MS je u načinu detekcije izabranih analita. Kod ICP-MS tehnike se detektuje  $M^+$  jon, dok se kod ICP-OES tehnike detektuju atomske i jonske linije koje su proizvod emisije fotona. ICP-MS tehnika ima bolju osjetljivost, gde su moguće kvantifikacije u koncentracijama u ppt opsegu. ICP-OES, s druge strane, ima veću robustnost od ICP-MS (Hou i sar. 2016; Man .i sar. 2017; Wilschefski i Baxter. 2019; Thomas 2008).



### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Sakupljanje uzoraka adrenalnog tkivnog materijala i pune krvi

Uzorci tkiva nadbubrežne žlezde i pune krvi sakupljani su u Centru za endokrinu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ukupno 70 pacijenata i 50 zdravih volontera je pismenim putem dobrovoljno dalo svoj pristanak za učešće u ovoj studiji. Sakupljanje kliničkih uzoraka za potrebe ove doktorske disertacije je odobrio Etički odbor Kliničkog centra Srbije u Beogradu (brojevi dozvola 971/7 i 87/14). Za realizaciju ove studije potpuno su implementirani etički standardi definisani Helsinškom deklaracijom i njenim daljim amandmanima.

Puna krv pacijenata sakupljana je u prepodnevnom časovima nakon noćnog gladovanja pre operacije, punktiranjem srednje kubitane vene sa unutrašnje strane lakta. Od svakog pacijenta je sakupljeno po 5 mL pune krvi u vakutajnere bez aditiva. Puna krv kontrolne grupe (zdravih volontera) uzorkovana je na isti način. Uzorci su bili čuvani u frižideru na 4 °C do transporta na Hemijski fakultet u Beogradu.

Preoperativna dijagnoza postavljena je primenom radioloških tehnika, uključujući ultrazvuk, CT i MR. Detaljna biohemijska (endokrinološka) procena svih pacijenata obavljena je pre operacije. Svi kandidati za hirurško lečenje bili su podvrgnuti laparoskopskoj adrenalektomiji u opštoj inhalacionoj anesteziji. Tkiva nadbubrežne žlezde uzorkovana su nakon adrenalektomije. Pored obolelog tkiva, zdravo (kontrolno) tkivo nadbubrežne žlezde uzorkovano je od istih pacijenata (eng. self-control group). Zdravo/kontrolno tkivo nadbubrega bilo je uzorkovano sa najveće moguće udaljenosti od jasno obeleženog obolelog tkiva, koje se evidentno makroskopski razlikovalo od zdravog tkiva. Osim preoperativne dijagnoze, finalna dijagnoza je potvrđena patohistološkom analizom uzoraka od strane dva nezavisna patologa. Takođe, patolozi su potvrdili da zdravo tkivo nadbubrega nema patološke promene, te se stoga može smatrati validnom kontrolnom grupom. Relevantni podaci poput pola, mesta prebivališta, starosti, pušačkog statusa, statusa adrenalnih hormona i veličine nodusa (tumora) bili su prikupljeni od svakog pacijenta (od strane lekara) pomoću adekvatnog epidemiološkog i kliničkog upitnika. Svi pacijenti koji su se izjasnili kao pušači, naveli su da su u proteklih 10 godina konzumirali najmanje 10 cigareta dnevno.

Pacijenti sa različitim oblicima maligniteta, hroničnim oboljenjima jetre i bubrega, dijabetesom, akutnim ili hroničnim infekcijama i drugim stanjima koja bi mogla uticati na sadržaj određivanih elemenata isključeni su iz ovog istraživanja radi eliminisanja uticaja endogenih varijabli na sadržaj ispitivanih elemenata. Takođe, učesnici koji su zaposleni u hemijskoj industriji i/ili na drugim radnim mestima koja mogu da utiču na unos toksičnih i/ili esencijalnih elemenata su isključeni iz studije.

#### 3.2. Hemikalije i instrumenti

Hemikalije visokog stepena čistoće korišćene u cilju pripreme kliničkih uzoraka za analizu, slepe probe i standardnih rastvora dostavio je „Merck“ (Darmstadt, Nemačka). „Berghof“-ov aparat za destilaciju koncentrovanih kiselina (BSB-939-IR) (Slika 42) korišćen je za naknadno prečišćavanje koncentrovane azotne kiseline.



Slika 42. Uređaj za redestilovanje azotne kiseline

Izvor: <https://www.berghof-instruments.com/en/products/distillacid-bsb939-ir/>

„Milli Q Plus“ sistem (Merk, Darmstadt, Nemačka) (Slika 43) korišćen je za dobijanje ultračiste vode (otpornost  $\geq 18,2 \text{ M}\Omega$ ) kojom su pripremani klinički uzorci za analizu, slepa proba i standardni rastvori. Plastično i stakno laboratorijsko posuđe korišćeno za realizaciju eksperimentalnog dela bilo je potopljeno u 10% azotnoj kiselini najmanje 24 h i detaljno isprano ultračistom vodom pre dalje upotrebe.



Slika 43. „Milli Q Plus“ sistem

Izvor: <https://www.merckmillipore.com>

Komercijalni multielementalni štok rastvori od 10 mg/L VHG Labs (Mančester, SAD) i 1000 mg/L Alfa Aesar (Karlsruhe, Nemačka) korišćeni za pripremu standardnih rastvora u cilju kvantifikacije elemenata od interesa.

„iCAP Q tuning B“ rastvor, koji sadrži 1  $\mu\text{g/L}$  Ba, Bi, Ce, Co, In, Li i U u 2%-tnoj azotnoj kiselini, korišćen je za optimizaciju instrumentalnih parametara ICP-MS instrumenta. Sertifikovani referentni materijali (SRM) pune krvi (Serorm<sup>®</sup>, SERO210105 Level-1 i SERO210205 Level-2, Norveška) i goveđe jetre (bovine liver NIST 1577c, SAD) korišćeni su za proveru tačnosti i preciznosti primenjenih analitičkih tehnika. Takođe, primenjena je i metoda standardnog dodatka za dodatnu proveru dobijenih rezultata, korišćenjem komercijalnih singleta standardnih rastvora svakog analiziranog elementa (10 mg/L za mikroelemente i 1000 mg/L za makroelemente) (VHG Labs, Mančester, SAD). Interni standard (IS) koji je korišćen (100  $\mu\text{g/mL}$  Li, Sc; 20  $\mu\text{g/mL}$  Bi, Ga, In, Tb, Y) nabavljen je od firme VHG (Mančester, SAD).

**Tabela 1.** Optimalni uslovi za ICP-OES i ICP-MS sa odabranim talasnim dužinama, izotopima i internim standardima (IS).

Parametar	ICP—OES	ICP—MS	
RF snaga (W)	1150	1550	
Protok argona (L/min)			
Spoljašnji (za hlađenje)	0,50	0,80	
Srednji (pomoćni)	0,50	1,13	
Unutrašnji (transportni)	12,0	16,0	
Nebulajzer (raspršivač)	Koncentično staklo	PFA—ST MicroFlow	
Komora za raspršivanje	Ciklonsko staklo	Ciklonsko staklo	
Ponavljanje snimanja	3	3	
Analiti	Talasna dužina (nm)	Izotop	IS
	Ca 317,933	<sup>55</sup> Mn	<sup>45</sup> Sc
	Mg 279,079	<sup>59</sup> Co	<sup>89</sup> Y
	Na 818,326	<sup>65</sup> Cu	<sup>115</sup> In
	K 766,490	<sup>66</sup> Zn	<sup>115</sup> In
		<sup>75</sup> As	<sup>89</sup> Y
		<sup>82</sup> Se	<sup>89</sup> Y
		<sup>111</sup> Cd	<sup>115</sup> In
		<sup>208</sup> Pb	<sup>209</sup> Bi
		<sup>238</sup> U	<sup>209</sup> Bi

Koncentracije esencijalnih i toksičnih mikroelemenata u kliničkim uzorcima određivane suprimenom ICP-MS (iCAP Qc, Thermo Scientific) tehnike. Kako bi se smanjile varijacije jonskog signala koje su posledica matriksa, razblaženi rastvor internog standarda (50 g/L <sup>7</sup>Li i 10 g/L <sup>71</sup>Ga, <sup>115</sup>In, <sup>208</sup>Bi) je ravnomerno uvođen u sve rastvore (slepa proba, standardni rastvori i klinički uzorci) pomoću sekundarnog kanala peristaltičke pumpe.

Relativna standardna devijacija (RSD) za tri koncentracije standardnih rastvora (10, 25 i 100 µg/L) za tri ponavljanja bila je 2,2% (ICP-MS preciznost unutar dana, engl. intra-day). RSD vrednost za rastvore istih koncentracija koji su snimani u tri ponavljanja tokom šest uzastopnih dana bila je 3,80% (međudnevna ICP-MS preciznost, engl. inter-day). Takođe, u cilju dodatne potvrde tačnosti obe implementirane analitičke tehnike, u pet uzoraka pune krvi i u pet uzoraka nadbubrežnog tkiva dodato je singlet standardni rastvor svakog elementa od interesa (10 µg/L i 25 µg/L za toksične i esencijalne mikroelemente, odnosno 10 µg/L i 25 mg/L za makroelemente).

**Tabela 2.** Izlazne vrednosti (R) za ispitivane elemente dobijene analizom različitih SRM materijala

Element	LOD <sup>*</sup>	Whole blood L—1 (µg/L)		R(% )	Whole blood L—2 (µg/L)		R(% )	Element	NIST 1577c bovine liver		R(% )
		Pronađen <sup>o</sup>	Certifikovan <sup>o</sup>		Pronađen <sup>o</sup>	Certifikovan <sup>o</sup>			Pronađen <sup>o</sup>	Certifikovan <sup>o</sup>	
Zn (mg/L)	0,14	4,06	4,20	96,7	6,80	7,10	95,8	Zn (µg/g)	179	181,1	98,8
Cu (µg/L)	0,61	0,57	0,63	90,5	1,20	1,34	89,5	Cu (µg/g)	277,8	275,2	101
Pb (µg/L)	0,07	8,92	9,90	90,1	355	337	105	Pb (ng/g)	60,3	62,8	96,0
Se (µg/L)	0,20	54,7	60,1	91,0	144	161	89,4	Se (µg/g)	2,103	2,031	104
Mn (µg/L)	0,04	17,2	18,4	93,5	33,1	31,4	105	Mn (ng/g)	11,01	10,46	105
Co (µg/L)	0,005	0,24	0,20	120	4,79	5,18	92,5	Co (µg/g)	0,279	0,300	93,0
Cd (µg/L)	0,011	0,27	0,28	96,4	4,68	5,01	93,4	Cd (ng/g)	99,1	97,0	102
As (µg/L)	0,01	4,33	4,60	94,1	14,9	14,1	106	As (ng/g)	20,2	19,6	103
U (µg/L)	0,002	0,17	0,18	94,4	0,17	0,18	94,4	U (N,D,)	—	N,D, <sup>ξ</sup>	—
Ca (mg/L)	1,87	14,4	15,2	94,7	14,7	15,2	96,7	Ca (µg/g)	129	131	98,5
Mg (mg/L)	4,77	13,2	14,6	90,4	13,3	14,4	92,4	Mg (µg/g)	625	620	101
Na (mg/L)	22,9	1700	1591	107	1681	1593	106	Na (%)	0,2024	0,2033	99,6
K (mg/L)	1,75	1115	1091	102	1022	1088	93,9	K (%)	1,021	1,023	99,8

\* LOD vrednosti određene za slepu probu (mg/L).

N.D. –nije detektovan.

**Tabela 3.** Metoda standardnog dodatka (R) za uzorke zdravog nadbubrežnog tkiva (ZAT), adenomatonog nadbubrežnog tkiva (AAT), zdrave (kontrolne) krvi i adenomatozne krvi

Element	R(%)		ZAT		AAT		Kontrolna krv		Adenomatozna krv	
	ZAT									
Mn	96,1*	96,3 <sup>ξ</sup>	98,4*	98,3 <sup>ξ</sup>	97,9*	97,4 <sup>ξ</sup>	98,1*	98,0 <sup>ξ</sup>		
Co	103*	103 <sup>ξ</sup>	101*	101 <sup>ξ</sup>	102*	102 <sup>ξ</sup>	102*	102 <sup>ξ</sup>		
Cu	97,3*	97,8 <sup>ξ</sup>	97,1*	97,0 <sup>ξ</sup>	99,5*	99,7 <sup>ξ</sup>	98,4*	98,8 <sup>ξ</sup>		
Zn	95,5*	95,1 <sup>ξ</sup>	104*	103 <sup>ξ</sup>	96,9*	97,4 <sup>ξ</sup>	102*	101 <sup>ξ</sup>		
As	99,0*	98,8 <sup>ξ</sup>	99,7*	99,3 <sup>ξ</sup>	99,3*	96,5 <sup>ξ</sup>	101*	102 <sup>ξ</sup>		
Se	103*	102 <sup>ξ</sup>	104*	103 <sup>ξ</sup>	104*	104 <sup>ξ</sup>	104*	103 <sup>ξ</sup>		
Cd	101*	101 <sup>ξ</sup>	102*	102 <sup>ξ</sup>	101*	102 <sup>ξ</sup>	101*	101 <sup>ξ</sup>		
Pb	97,7*	97,6 <sup>ξ</sup>	98,7*	99,0 <sup>ξ</sup>	98,2*	98,4 <sup>ξ</sup>	99,1*	98,4 <sup>ξ</sup>		
U	98,8*	98,5 <sup>ξ</sup>	98,6*	98,8 <sup>ξ</sup>	98,4*	98,1 <sup>ξ</sup>	97,6*	98,0 <sup>ξ</sup>		
Na	103**	103 <sup>ξξ</sup>	101**	102 <sup>ξξ</sup>	102**	103 <sup>ξξ</sup>	105**	104 <sup>ξξ</sup>		
K	98,2**	99,1 <sup>ξξ</sup>	101**	101 <sup>ξξ</sup>	97,4**	97,8 <sup>ξξ</sup>	99,2**	99,0 <sup>ξξ</sup>		
Mg	99,4**	99,0 <sup>ξξ</sup>	99,1**	99,7 <sup>ξξ</sup>	89,9**	97,5 <sup>ξξ</sup>	101**	100 <sup>ξξ</sup>		
Ca	98,2**	98,0 <sup>ξξ</sup>	99,6**	99,5 <sup>ξξ</sup>	89,4**	99,1 <sup>ξξ</sup>	105**	105 <sup>ξξ</sup>		

\*spajkovano sa 10 µg/L; \*\* spajkovano sa 10 mg/L; <sup>ξ</sup> spajkovano sa 25 µg/L; <sup>ξξ</sup> spajkovano sa 25 mg/L

**Tabela 4.** Metoda standardnog dodatka (R) za uzorke tkiva feohromocitoma (PCC), adrenalnog tkiva obolelog od Kušingovog sindrom (CST), krvi pacijenata obolelih od feohromocitoma i krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma.

Element	R(%)							
	PCC		CST		Feohromocitomi-krv		Kušingov sindrom-krv	
Mn	96,4*	96,1 <sup>ξ</sup>	98,1*	98,4 <sup>ξ</sup>	97,2*	96,8 <sup>ξ</sup>	98,4*	98,1 <sup>ξ</sup>
Co	102*	101 <sup>ξ</sup>	102*	103 <sup>ξ</sup>	103*	101 <sup>ξ</sup>	101*	103 <sup>ξ</sup>
Cu	98,0*	97,2 <sup>ξ</sup>	97,3*	97,1 <sup>ξ</sup>	99,9*	99,6 <sup>ξ</sup>	98,2*	98,3 <sup>ξ</sup>
Zn	95,2*	95,5 <sup>ξ</sup>	103*	102 <sup>ξ</sup>	97,1*	97,3 <sup>ξ</sup>	101*	102 <sup>ξ</sup>
As	98,5*	98,3 <sup>ξ</sup>	99,1*	98,8 <sup>ξ</sup>	98,3*	96,6 <sup>ξ</sup>	103*	101 <sup>ξ</sup>
Se	101*	103 <sup>ξ</sup>	101*	102 <sup>ξ</sup>	102*	103 <sup>ξ</sup>	102*	101 <sup>ξ</sup>
Cd	103*	102 <sup>ξ</sup>	103*	101 <sup>ξ</sup>	100*	101 <sup>ξ</sup>	103*	102 <sup>ξ</sup>
Pb	97,4*	97,1 <sup>ξ</sup>	98,9*	99,1 <sup>ξ</sup>	98,9*	99,1 <sup>ξ</sup>	98,9*	98,5 <sup>ξ</sup>
U	98,2*	98,3 <sup>ξ</sup>	99,0*	98,9 <sup>ξ</sup>	98,3*	98,4 <sup>ξ</sup>	97,8*	98,1 <sup>ξ</sup>
Na	104**	102 <sup>ξξ</sup>	103**	104 <sup>ξξ</sup>	101**	100 <sup>ξξ</sup>	103**	101 <sup>ξξ</sup>
K	99,5**	99,3 <sup>ξξ</sup>	102**	103 <sup>ξξ</sup>	97,2**	97,5 <sup>ξξ</sup>	98,8**	99,1 <sup>ξξ</sup>
Mg	99,2**	98,7 <sup>ξξ</sup>	99,4**	99,1 <sup>ξξ</sup>	96,3**	96,9 <sup>ξξ</sup>	99,8**	99,6 <sup>ξξ</sup>
Ca	98,0**	98,1 <sup>ξξ</sup>	99,3**	99,6 <sup>ξξ</sup>	99,4**	99,5 <sup>ξξ</sup>	106**	104 <sup>ξξ</sup>

\*spajkovano sa 10 µg/L; \*\* spajkovano sa 10 mg/L; <sup>ξ</sup> spajkovano sa 25 µg/L; <sup>ξξ</sup> spajkovano sa 25 mg/L

### 3.3. Priprema kliničkih uzoraka mikrotalasnom digestijom

Tačna masa svakog uzorka (oko 0,5 g) izmerena je u mikrotalasni kivetama na analitičkoj vagi. Uzorcima bi se nakon merenja dodavana smeša ultra-čiste koncentrovane azotne kiseline (65%) i vodonik-peroksida (30%) u zapreminskom odnosu 4:1. Uzorci su podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji (Speedwave XPERT, Berghof, Nemačka) (slika 44) korišćenjem sledećeg postupka: zagrevanje 3 minuta do 85 °C, zagrevanje 7 minuta do 130 °C, zagrevanje 5 min do 180 °C i održavanje temperature na 180 °C još 20 minuta.

Uzorci su, nakon završene digestije i hlađenja, bili prebačeni u normalne sudove, koji su dopunjeni ultračistom vodom do 25 mL. Standardni referentni materijali su rekonstruisani pažljivo u skladu sa uputstvima dobijenim od proizvođača, nakon čega su povrgnuti analizi na isti način kao i klinički uzorci.



Slika 44. Uređaj za mikotalasnu digestiju

Izvor: <https://www.berghof-instruments.com/en/products/speedwave-xpert/>

Makroelementi su kvantifikovani u opsegu od 1 mg/L do 30 mg/L, dok je opseg za mikroelemente bio 1 - 300 µg/L. Korišćene su standardne serije od po šest tačaka za kalibraciju obe tehnike, gde je koeficijent korelacije bio veći od 0,996 za svaki element. Dobijene izlazne R vrednosti za analizirane SRM uzorke bile su u opsegu od 89,4% do 106%.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Deskriptivna statistika, Šapiro-Vilkov test (Shapiro-Wilk test), Man-Vitnijev U test (Mann-Whitney U test ) i Spirmanov test korelacije ranga (Spearman test) sprovedeni su korišćenjem statističkog softvera IBM SPSS Statistics Software v.20.

Analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis, PCA ) implementirana je korišćenjem PLS ToolBox—a, v.6.2.1 (MATLAB 7.12.0). Stepen statističke značajnosti svih statističkih testova bio je definisan na  $p < 0,05$

### 4.1. Adrenalni adenomi

#### 4.1.1. Adrenalni tkivni materijal

U tabeli 5 prikazane su srednja vrednost, standardna devijacija (st. dev.), minimalne (min), maksimalne (max) vrednosti i medijana, zajedno sa vrednostima geometrijske sredine (GM) i odabranim percentilima (P5—P95) za koncentracije određivanih esencijalnih i toksičnih mikroelemenata i makroelemenata u analiziranim uzorcima zdravog adrenalnog tkivnog (ZAT) materijala i adenomatoznog adrenalnog tkivnog (AAT) materijala.

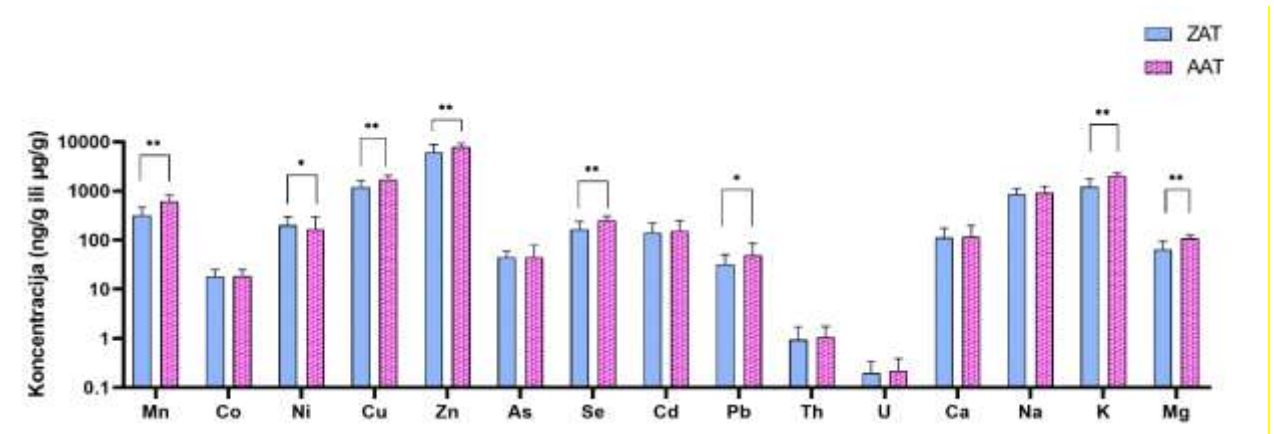


**Tabela 5.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) i u uzorcima ZAT i AAT. Razlike između grupa ispitane su Mann–Whitney U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
ZAT	sr,vrednost	319	18,0	201	1209	6134	44,8	166	142	32,1	0,94	0,20	112	859	1233	64,0
	st,dev,	146	7,01	91,4	417	2613	14,0	72,1	81,2	18,6	0,79	0,14	64,0	260	564	30,3
	Min	91	8,02	72,6	574	1666	16,7	56,2	9,03	9,51	0,13	0,11	43,3	348	298	13,8
	max	603	32,9	441	1913	10718	87,9	333	282	94,8	3,09	0,77	414	1468	2336	115
	medijana	317	17,5	187	1208	6138	45,0	168	140	30,7	0,63	0,16	104	860	1232	65,6
	GM	301	16,4	183	1089	5315	46,3	155	101	29,9	0,68	0,18	97,6	829	1053	54,1
	P5	115	8,02	89,2	567	1789	28,6	65,2	13,6	15,3	0,18	0,11	43,8	417	306	15,8
	P25	221	9,99	133	675	2496	35,9	96,9	93,4	20,0	0,36	0,13	71,8	626	779	38,7
	P75	450	24,3	236	1523	9530	56,8	220	231	42,0	1,34	0,34	115	1028	1686	86,4
	P95	591	31,7	403	1907	10657	83,8	309	284	83,7	2,82	0,67	287	1412	2233	114
AAT	sr,vrednost	612	18,6	166	1731	7839	44,8	253	153	49,6	1,05	0,22	117	924	2019	108
	st,dev,	209	6,50	129	329	1393	33,0	52	94,1	36,7	0,71	0,17	80,6	324	379	19,8
	Min	283	9,90	41,0	1031	4011	12,7	175	28,2	7,70	0,22	0,05	43,4	544	916	52,1
	Max	1126	36,1	556	2277	10338	170,4	378	444	159	2,65	0,85	414	1948	2629	140
	medijana	611	18,3	134	1729	7840	44,3	251	153	45,6	0,81	0,19	95,5	921	2024	107
	GM	540	17,9	130	1702	7807	31,9	259	143	48,3	0,84	0,18	99,5	918	1787	109
	P5	284	10,2	42,4	1109	4392	13,7	185	30,3	18,8	0,29	0,07	49,8	568	490	28,3
	P25	384	13,0	75,1	1442	7113	19,8	200	84,7	34,4	0,54	0,11	71,2	665	1866	101
	P75	644	21,2	229	2147	9316	76,9	326	202	75,1	1,46	0,25	128	1134	2437	130
	P95	1113	35,5	503	2274	10461	160,5	369	413	149	2,54	0,75	359	1938	2601	137
U — test	P—vrednost	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>

Uočava se da je Zn bio najzastupljeniji mikroelement u ZAT uzorcima, zatim Cu, Mn, Ni, Se, Cd, As, Pb, Co, Th i na kraju U. Sličan redosled mikroelemenata uočava se kod AAT uzoraka: Zn > Cu > Mn > Se > Ni > Cd > Pb > As > Co > Th > U. Adrenalni tkivni materijali pokazali su istu raspodelu makroelemenata; najzastupljeniji element bio je K, zatim Na, Ca, pa Mg.

Šapiro-Vilkov test ukazao je na neparametrijsku raspodelu koncentracije elemenata u uzorcima, zbog čega su razlike između grupa ispitane Man-Vitni U testom. Utvrđeno je da su koncentracije Mn, Cu, Zn, Se, K, Mg i Pb značajno veće u AAT uzorcima, dok je Ni je bio veći u ZAT uzorcima u poređenju sa AAT (tabela 5, slika 45).



**Slika 45.** Koncentracije mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima ZAT i AAT. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0,05$ ) i \*\* ( $P < 0,01$ ).

Dobijeni rezultati za ZAT uzorke dodatno su podeljeni na osnovu pola (žene i muškarci), godina (ispod i iznad srednje vrednosti godina koja je iznosila 55 godina) i pušačkog statusa (nepušači i pušači) (tabela 6).

Mangan se u ZAT uzorcima istakao kao mikroelement značajno veće koncentracije kod muškaraca u odnosu na žene, dok su Se i Pb bili značajno veći u grupi ispitanika mlađih od 55 godina. Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentracijama određivanih elemenata između pušača i nepušača. Može se uočiti da je Cd imao veće koncentracije u ZAT uzorcima pušača, iako nije bilo statistički značajne razlike.

**Tabela 6.** Prikaz koncentracija mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u ZAT uzorcima, razdvojenih na osnovu pola (žene i muškarci), godina (ispod 55 godina i iznad 55 godina) i konzumiranja duvana (pušači i nepušači). Razlike između grupa određene su primenom Man—Vitni U testa ( $P < 0.05$ ). Statistički značajne razlike su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Žene	Sr, vrednost	308	17,4	215	1129	6290	49,1	167	163	34,7	0,93	0,21	169	1018	1305	72
	st,dev,	146	8,18	102	399	3125	18,3	57,1	93,9	22,1	0,86	0,09	108	366	623	41
	medijana	309	15,2	197	1135	6353	42,5	172	179	28,1	0,63	0,19	377	1667	2336	164
Muškarci	Sr, vrednost	429	20,1	165	1329	5953	47,9	187	89,2	33,3	0,96	0,16	106	994	1594	84
	st,dev,	134	7,09	31,6	598	2919	9,31	110	47,0	15,2	0,56	0,05	40	289	757	36
	medijana	434	22,2	170	1403	5887	51,4	167	107	30,4	0,76	0,14	179	1450	2546	124
U—test	P—vrednost	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
<55 god	Sr, vrednost	338	16,1	183	1273	6610	51,0	196	132	28,7	0,88	0,22	117	912	1274	68,1
	st,dev,	162	7,14	75,1	491	3231	20,8	77,1	82,4	9,7	0,58	0,09	76,4	357	573	34,3
	medijana	348	15,3	184	1286	7001	46,4	192	125	28,7	0,73	0,20	87	924	1202	76,0
>55 god,	Sr, vrednost	332	20,0	217	1056	5573	45,6	142	149	40,2	1,00	0,17	118	926	1225	63
	st,dev,	148	8,37	105	417	2847	8,64	61,7	99,9	26,4	0,96	0,07	69,8	321	712	34
	medijana	352	20,6	193	1066	6348	44,7	164	166	27,7	0,49	0,14	99	859	1332	73
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Pušači	Sr, vrednost	334	15,3	184	1067	5721	45,2	178	158	33,9	0,98	0,21	90	867	1094	57
	st,dev,	150	6,13	61,7	414	2902	14,6	78,2	103	14,3	0,62	0,10	38,7	326	639	34,5
	medijana	352	14,4	185	1101	6353	42,5	172	130	32,9	1,04	0,18	83	776	1162	71
Nepušači	Sr, vrednost	349	22,4	227	1356	6920	54,0	165	121	35,1	0,89	0,18	144	906	1465	75
	st,dev,	158	8,50	121	486	3188	17,6	68,3	61,8	27,5	1,01	0,05	95,7	306	628	38,4
	medijana	357	24,5	189	1421	7001	52,2	182	122	23,8	0,46	0,18	106	924	1636	87
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Tabela 7.** Koncentracije makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) i mikroelemenata ( $\text{ng/g}$ ) u AAT uzorcima podeljenim po polu i godinama. Razlike između grupa su ispitane Man-Vitni U testom ( $P < 0.05$ ). Statistički značajne razlike su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Žene	Sr,vrednost	619	19,6	177	1771	8317	36,6	276	168	63,7	1,05	0,24	97,2	1013	2005	105
	st.dev,	277	8,05	143	340	1295	17,8	84,4	118	40,5	0,78	0,22	54,1	571	616	30,4
	medjana	549	18,6	134	1722	7933	35,9	243	167	58,9	0,78	0,17	232	2364	2695	138
Muškarci	Sr,vrednost	506	18,0	137	1667	7195	32,7	252	97,5	44,2	1,05	0,17	184	1004	1800	99,0
	st.dev,	147	5,43	80,3	470	2440	8,58	82,1	39,5	26,0	0,49	0,04	157	346	768	43,4
	medjana	550	18,4	109	1737	7612	32,2	228	88,5	35,1	0,86	0,16	414	1444	2453	140
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05
<55 god	mean	555	20,9	136	1806	8398	35,9	299	115	52,0	1,09	0,19	115	836	2237	119
	st.dev,	258	5,58	77,2	336	1336	15,4	96,2	58,2	22,1	0,70	0,08	114	196	349	17,6
	median	520	20,5	130	1852	8363	35,3	289	111	43,1	0,87	0,17	82	768	2157	116
>55 god	mean	627	17,1	201	1671	7583	35,1	236	189	65,9	1,01	0,26	120	1124	1661	88
	st.dev,	246	8,78	166	414	2022	16,8	49,9	136	49,9	0,73	0,26	61,4	657	730	36,8
	median	589	13,5	157	1592	7767	33,9	233	176	58,0	0,69	0,17	86,3	1088	2002	103
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Rezultati dobijeni za AAT uzorke takođe su razdvojeni na osnovu pola, godina, konzumiranja duvana i veličine tumorske mase (ispod i iznad 4 cm), kako bi se uočilo da li postoje značajne razlike u koncentracijama određivanih elemenata (tabele 7 i 8).

U AAT uzorcima žena uočene su značajno veće koncentracije Cd kao i Pb u odnosu na muškarce, dok su muškarci imali veće koncentracije Ca u AAT uzorcima. Koncentracija Cd je takođe bila veća u AAT uzorcima osoba starijih od 55 godina i kod pušača, dok je Pb bio značajno manjih koncentracija kod nepušača. U odnosu na veličinu tumorske mase, Mn, Ni, Pb i U bili su značajno veći u tumorskim masama većeg prečnika AAT uzoraka.

**Tabela 8.** Koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) i u AAT uzorcima podeljenim prema konzumiranju duvana i veličini nodula. Razlike između grupa su ispitane sa Man-Vitni U testom ( $P < 0.05$ ). Statistički značajne razlike su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Pušači	Sr.vrednost	632	17,6	156	1726	7985	34,4	267	191	67,7	1,14	0,18	108	760	2127	111
	st.dev.	269	6,44	90,0	274	1477	16,1	92,3	114	38,3	0,72	0,09	87,1	195	358	19,5
	medjana	549	16,9	142	1722	7767	34,8	238	176	63,3	0,91	0,17	80	691	2131	108
Nepušači	Sr.vrednost	524	21,6	183	1768	8067	37,2	274	86,2	44,6	0,91	0,29	127	1317	1693	93
	st.dev.	218	8,30	175	500	2079	15,9	70,7	55,7	33,7	0,68	0,27	63	640	832	43
	medjana	512	19,9	111	1841	8363	36,5	274	67,1	34,9	0,73	0,16	101	1123	1864	101
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05
< 4 cm	Sr.vrednost	478	16,4	94,2	1702	7952	31,0	298	153	41,3	0,92	0,16	140	918	2145	116
	st.dev.	144	5,14	44,6	389	1870	16,4	98,7	83,5	19,2	0,71	0,09	124	459	352	18,7
	medjana	497	15,7	81,6	1654	8222	26,2	289	160	37,3	0,73	0,14	83	776	2061	112
> 4 cm	Sr.vrednost	716	22,3	249	1790	8094	40,7	237	145	78,1	1,20	0,30	98,2	1104	1763	91
	st.dev.	291	8,43	146	364	1574	13,9	45,2	132	44,5	0,69	0,24	40,1	578	813	39,8
	medjana	609	19,9	230	1800	7776	42,4	242	107	65,5	0,91	0,21	83	901	2131	108
U—test	P—vrednost	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Rezultati Spirmanove korelacione analize za zdrave i patološki izmenjene adrenalne tkivne materijale prikazani su u tabelama 9 i 10. Sličan obrazac dobijen je između elemenata u ZAT i AAT uzorcima. Većina esencijalnih mikroelemenata (Mn, Cu, Zn i Se) pokazala je pozitivne i slične vrednosti koeficijenata korelacije u ZAT i AAT uzorcima. Među toksičnim mikroelementima, samo Th i U pokazali su značajnu negativnu korelaciju sa esencijalnim mikroelementima. Nije pronađena statistički značajna razlika između Co, As, i Pb sa drugim elementima u tragu u HAT ili AAT uzorcima. Najjača pozitivna korelacija u ZAT uzorcima uočena je između K i Mg, a najjača negativna između Mn i U (tabela 9). AAT uzorci su ukazali da je najjača pozitivna korelacija između mikroelemenata Mn i Cu, dok su Zn i U ukazali na najjaču negativnu korelaciju (tabela 10).

**Tabela 9.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u ZAT uzorcima. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	-0,392	<b>0,774</b>	<b>0,850</b>	<b>0,819</b>	-0,130	<b>0,737</b>	<b>0,611</b>	-0,203	<b>-0,673</b>	<b>-0,816</b>	0,346	0,296	0,026	0,088
Co		1	-0,374	-0,356	-0,316	0,009	-0,347	-0,201	0,255	0,356	0,343	0,356	0,310	0,084	0,146
Ni			1	<b>0,792</b>	<b>0,804</b>	-0,121	<b>0,635</b>	<b>0,465</b>	0,009	<b>-0,658</b>	<b>-0,800</b>	0,189	0,146	0,213	0,147
Cu				1	<b>0,862</b>	-0,127	<b>0,786</b>	<b>0,639</b>	-0,139	<b>-0,709</b>	<b>-0,802</b>	0,370	0,191	-0,098	-0,031
Zn					1	-0,088	<b>0,718</b>	<b>0,619</b>	-0,102	<b>-0,723</b>	<b>-0,756</b>	0,236	0,197	0,196	0,020
As						1	-0,167	-0,246	0,052	0,073	0,289	<b>0,510</b>	<b>0,440</b>	<b>0,538</b>	<b>0,592</b>
Se							1	<b>0,647</b>	0,008	<b>-0,591</b>	<b>-0,742</b>	0,270	0,280	-0,022	0,030
Cd								1	-0,278	-0,404	<b>-0,512</b>	0,157	0,151	0,088	<b>-0,630</b>
Pb									1	0,202	0,116	0,328	0,345	0,371	0,350
Th										1	<b>0,782</b>	0,177	0,396	0,082	0,210
U											1	-0,024	0,195	0,077	0,234
Ca												1	<b>0,606</b>	0,185	0,324
Na													1	<b>0,508</b>	<b>0,541</b>
K														1	<b>0,910</b>
Mg															1



**Tabela 10.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u AAT uzorcima. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	-0,186	<b>0,597</b>	<b>0,850</b>	<b>0,756</b>	-0,248	<b>0,727</b>	<b>0,547</b>	0,116	<b>-0,773</b>	<b>-0,806</b>	0,042	0,051	0,093	0,248
Co		1	-0,027	-0,178	-0,169	0,373	-0,136	-0,086	0,211	0,386	0,238	-0,330	-0,231	0,012	-0,306
Ni			1	<b>0,578</b>	<b>0,584</b>	0,028	<b>0,526</b>	0,261	0,195	<b>-0,507</b>	<b>-0,517</b>	0,299	0,357	0,040	0,248
Cu				1	<b>0,805</b>	-0,214	<b>0,766</b>	<b>0,562</b>	0,179	<b>-0,791</b>	<b>-0,798</b>	0,132	0,039	-0,070	-0,023
Zn					1	-0,322	<b>0,878</b>	<b>0,534</b>	0,069	<b>-0,754</b>	<b>-0,821</b>	-0,188	-0,229	0,007	0,018
As						1	-0,310	-0,177	0,032	0,403	0,434	0,184	0,136	0,012	0,177
Se							1	<b>0,506</b>	0,009	<b>-0,741</b>	<b>-0,797</b>	0,010	-0,035	0,024	-0,018
Cd								1	0,153	<b>-0,533</b>	<b>-0,573</b>	-0,213	-0,362	0,143	0,318
Pb									1	-0,024	-0,099	0,184	0,437	0,012	0,179
Th										1	<b>0,845</b>	0,259	0,157	0,226	0,403
U											1	0,416	-0,049	-0,043	-0,146
Ca												1	<b>0,739</b>	-0,171	0,116
Na													1	-0,258	-0,033
K														1	<b>0,710</b>
Mg															1

Nadbubrežne žlezde su izuzetno podložne endokrinoj disrupciji, budući da su visoko prokrvljene, imaju lipofilnu strukturu i sadrže citohrom P450 (CIP), koji doprinosi stvaranju toksičnih metabolita i slobodnih radikala. Supstance koje narušavaju funkciju endokrinog sistema (poznate kao endokrini disruptori, engl. endocrine disrupting chemicals, EDC) mogu imati različite efekte na adrenalnu homeostazu. Međutim, precizni mehanizmi njihovog delovanja još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, s obzirom na uticaj različitih faktora, kao što su stepen i način izloženosti. Poznato je da EDC mogu imati negativan efekat na sintezu i sekreciju hormona, kao i na njihov transport i vezivanje za receptore, što za posledicu ima izmenjenu funkciju rada nadbubrežne žlezde, čime se podstiče nastanak oboljenja. Neki od toksičnih mikroelemenata prepoznati su kao EDC i najnovija istraživanja ukazuju na to da mogu izazvati određene epigenetske promene. Toksični mikroelementi, poput Pb, As i Cd, mogu imati negativan uticaj na funkciju nadbubrega inhibirajući i/ili modulirajući enzime koji učestvuju u steroidogenezi, kao što je 5- $\alpha$ -reduktaza, enzim za čije je funkcionisanje neophodan Zn, koji igra važnu ulogu u aktivaciji receptora za steroidne hormone (Diamanti-Kandarakis i sar. 2009, Hinson i Raven 2006).

Rezultati elementalne analize pokazali su da se AAT uzorci jasno razdvajaju od ZAT uzoraka po svom elementalnom profilu. U poređenju sa ZAT uzorcima, AAT uzorci imali su nižu koncentraciju Ni i višu koncentraciju Pb. S obzirom da elementalni profil ZAT uzoraka do sada nije razjašnjen, teško je načiniti uporednu analizu dobijenih rezultata sa vrednostima iz literature. Ovo ujedno ukazuje da je ova studija pionirska u metalomskom istraživanju.

Izmenjen elementalni profil AAT uzoraka ogleda se i u povišenoj koncentraciji esencijalnih mikroelemenata (Mn, Cu, Zn, Se). Imajući u vidu da su pomenuti esencijalni mikroelementi značajni kao kofaktori ili aktivatori različitih enzima/proteina, dobijeni rezultati mogu pružiti značajne podatke za dalja biohemijska istraživanja u ovoj oblasti.

Nadbubrežne žlezde imaju složenu regulaciju koja uključuje niz enzimskih i metaboličkih procesa, ali tačna uloga esencijalnih mikroelemenata u ovim procesima nije dovoljno istražena. Imajući u vidu da su nadbubrežne žlezde sekretujuće i metabolički bogati organi, visoke koncentracije esencijalnih mikroelemenata mogu ukazivati na prisustvo pojačanih enzimskih i antioksidativnih mehanizama.

Hao i saradnici su utvrdili da se Mn akumulira u mitohondrijama i da povišene koncentracije ovog mikroelementa mogu indukovati oksidativni stres utičući na aktivnost SOD (Hao i sar. 2020). Studija sprovedena od strane Raza i saradnika sugerisala je da Mn ima važnu ulogu u regulaciji nadbubrežne steroidogeneze, kao kofaktor mitohondrijalne SOD (Raza i sar. 2005). Miller i Miller (2018) su zabeležili koncentracije Mn u tkivima nadbubrežne žlezde od 0,20  $\mu\text{g/g}$  i 0,69  $\mu\text{g/g}$ , što je u skladu sa nalazima ove disertacije koji iznose 0,32  $\mu\text{g/g}$  za zdrav adrenalni tkivni materijal (Miller i Miller 2018). Plum i saradnici naglasili su negativan uticaj povišenog sadržaja Zn na steroidogenezu nadbubrežne žlezde (Plum i sar. 2010). Takođe, uočeno je da visok sadržaj Zn može akutno i privremeno da inhibira lučenje kortizola iz nadbubrežnog korteksa (Brandao-Neto i sar. 1990).

Chanoine i saradnici istakli su da nedostatak Se dovodi do smanjenja aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx) u nadbubrežnoj žlezdi pacova (Chanoine i sar. 2004). Povišene koncentracije Se i drugih esencijalnih mikroelemenata prikazane u rezultatima ove studije mogu ukazivati na izmenjenu regulaciju ćelijskih proteina, poput antioksidativnih enzima.

Zbog veće gustine ćelija i razvijenije vaskularizacije, visoke koncentracije esencijalnih mikroelemenata u AAT uzorcima mogu biti posledica povećanog unosa iz

krvotok. Deregulacija u funkcionisanju nadbubrega često je praćena formiranjem slobodnih radikala, čije uspešno uklanjanje zavisi od antioksidativnog kapaciteta. Aktivnost određenih antioksidativnih enzima zavisi od prisustva Se u odgovarajućoj koncentraciji. Kohrle i saradnici ističu da nadbubrežne žlezde imaju tendenciju da akumuliraju Se u slučaju nedovoljnih koncentracija ovog mikroelementa u organizmu (Kohrle i sar. 2005), čime bi mogao da se objasni protektivni uticaj Se na suzbijanje oksidativnog stresa.

Poznato je da su Cu i Zn komponente citoplazmatske SOD, koja ima ulogu u uklanjanju slobodnih radikala (Gaetke i sar. 2014). Gaetke i saradnici su uvrđili da visoka koncentracija Cu može imati štetan efekat na endokrini sistem organa i njegov odgovor na oksidativni stres (Gaetke i sar. 2014), dok Brandao-Neto i saradnici navode da visoka koncentracija Zn ima inhibitorski efekat na lučenje kortizola (Brandao-Neto i sar. 1990). Povišene koncentracije esencijalnih mikroelemenata (Mn, Cu, Zn, i Se) u AAT uzorcima u ovoj studiji mogu sugerisati njihov povećani unos u nadbubrežna tkiva, što je u skladu sa smanjenim koncentracijama istih mikroelemenata u uzorcima adenomatozne krvi. Takođe, rezultati prikazani u ovoj disertaciji mogu da sugerišu izmenjenu homeostazu nadbubrežnih žlezdi usled prisustva oboljenja i da istaknu značaj izmenjenih koncentracija esencijalnih elemenata u patogenezi adrenalnih adenoma.

Olovo je istaknuto kao jedini neesencijalni mikroelement koji se pokazao statistički značajnim u razdvajanju AAT uzoraka od ZAT. Profesionalna izloženost Pb i izloženost putem životne sredine predstavlja jedan od globalnih zdravstvenih problema (Yang i sar. 2013). Čak i u zemljama gde su uloženi znatni naponi da se smanji antropogeni uticaj emisije Pb u životnu sredinu, značajne količine ovog toksičnog mikroelementa su akumulirane u zemljištu i mogu uticati na opšte zdravlje narednih generacija. Istraživanja ukazuju na to da akumulirano Pb u organizmu može štetno uticati na endokrinu homeostazu, što uključuje i homeostazu nadbubrežne žlezde (Yang i sar. 2013, Tong i sar. 2000). Doumouchsis i saradnici otkrili su histološke/citološke promene u parenhimu nadbubrežne žlezde koje mogu izazvati promene u koncentraciji kortikosterona u krvnoj plazmi (Doumouchsis i sar. 2009). Smanjeni nivoi kortikosteroida primećeni su i kod radnika izloženih Pb. Takođe, uočeno je i smanjenje nivoa kortizola u serumu radnika sa umerenom izloženošću Pb. Hinson i Raven objavili su da Pb može pojačati lučenje aldosterona utičući na aktivnost aldosteron-sintaze (Hinson i Raven 2006). Rezultati ove disertacije ukazali su da je koncentracija Pb bila oko 1.5 puta viša u AAT uzorcima u odnosu na ZAT, što bi moglo da ukazuje na njegov značaj u etiologiji adrenalnih adenoma.

Kadmijum je odavno prepoznat kao endokrini disruptor (Qayyum i sar. 2019, Wang i sar. 2014). Rezultati ovog istraživanja ukazali su na povišen Cd u AAT uzorcima pušača, bez statistički značajne razlike, što bi moglo da se objasni nedovoljnim brojem ispitanika uključenih u ovo istraživanje. Poznato je da su jedan od glavnih izvora Cd cigarete (Song i Li 2014). Repić i saradnici su naveli da se koncentracije Cd i Pb značajno razlikuju između humanih bioloških materijala pušača i nepušača (Repić i sar. 2020). Veliki broj studija ukazao je da oba mikroelementa imaju tendenciju da se akumuliraju u različitim ljudskim tkivima. Rezultati ove disertacije sugerišu da AAT uzorci imaju sposobnost da akumuliraju Cd i Pb, koji mogu uticati na antioksidativni kapacitet tkiva promenom aktivnosti SOD i drugih enzima. Takođe, uočeno je da pušači imaju višu koncentraciju Cd u analiziranim adrenalnim tkivnim materijalima.

Uzorci AAT sakupljeni od pacijenata sa tumorskim nodusima većim od 4 cm imali su značajno više koncentracije esencijalnog Mn i toksičnog Pb, kao i viši Ni i U. Ovaj nalaz se može objasniti vremenski zavisnom akumulacijom ovih mikroelemenata u tumorima većeg prečnika. Može se pretpostaviti da ovi mikroelementi mogu igrati potencijalnu ulogu u progresiji benignog tumora i dovesti do dalje maligne alteracije. Međutim, ovu hipotezu

treba razjasniti u narednim studijama na uzorcima nadbubrežne žlezde sa dijagnostikovanim malignim promenama.

Uzorci AAT imali su veće koncentracije makroelemenata K i Mg u odnosu na ZAT. U literaturi je opisano da K utiče na regulaciju lučenja mineralokortikoida negativnom povratnom spregom, kao i na proliferaciju i diferencijaciju ćelija (Chen i sar. 2015). Bandulik i saradnici ukazali su da deregulisana funkcija K<sup>+</sup> kanala i njihova povećana ekspresija mogu izazvati prekomernu proliferaciju kortikalnog tkiva nadbubrežne žlezde (Bandulik i sar. 2015). Neki literaturni nalazi ukazuju da na izlučivanje kortizola mogu uticati povišene koncentracije Mg (Murck i sar. 2002).

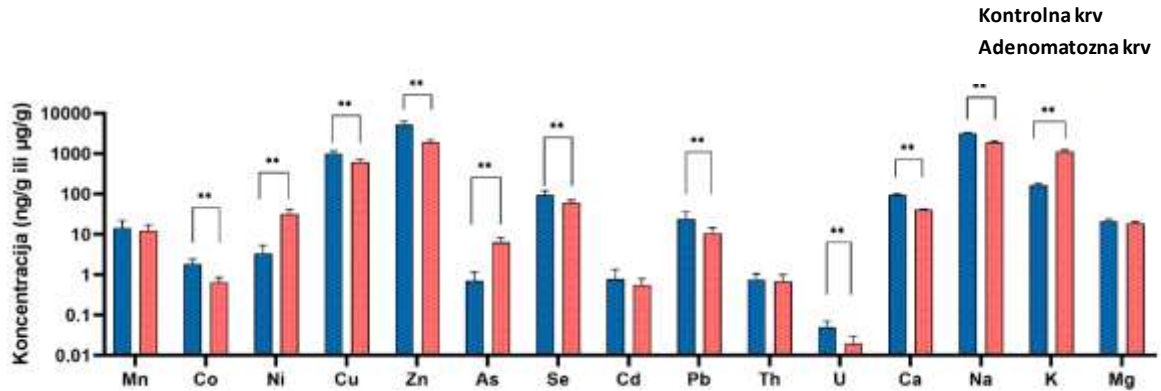
#### ***4.1.2. Puna krv***

U tabeli 11 prikazane su vrednosti koncentracija određivanih elemenata u uzorcima pune krvi kontrolne grupe i pune krvi pacijenata sa adrenalnim adenomima. Analiza pune krvi pacijenata sa adrenalnim adenomima takođe je istakla cink kao najdominantniji mikroelement kao i kod uzoraka adrenalnog tkivnog materijala. Drugi najzastupljeniji element bio je Cu, kojeg je sledio Se, zatim Mn, Pb, As, Co, Cd i U. Uzorci pune krvi kontrola imali su nešto drugačiji raspored mikroelemenata: Zn, Cu, Se, Pb, Mn, Co, Cd, As i U. Najzastupljeniji makroelement u kontrolnim uzorcima pune krvi i u punoj krvi pacijenata bio je Na, zatim K, Ca, pa Mg.

**Tabela 11.** Parametri deskriptivne statistike i odabrani percentili koncentracija mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima kontrolne krvi i adenomatozne krvi. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Kontrolna krv	sr.vrednost	14,6	1,88	3,36	1006	5147	0,70	93,3	0,78	23,8	0,76	0,05	94,2	3235	163	21,2
	st.dev.	7,10	0,58	2,02	203	1130	0,49	28,0	0,57	12,1	0,31	0,02	6,32	71,6	19,9	3,20
	Min	4,50	0,59	1,57	561	3268	0,02	46,0	0,10	6,10	0,41	0,01	84,8	3128	135	16,0
	Max	36,1	2,95	12,3	1468	8194	2,38	157	2,14	47,2	1,56	0,11	103	3359	198	26,8
	medijana	13,0	1,91	2,70	1021	5084	0,66	85,1	0,65	26,2	0,67	0,05	95,3	3234	159	21,2
	GM	13,3	1,71	3,11	1039	5012	0,46	89,6	0,66	23,4	0,69	0,04	94,8	3248	160	20,9
	P5	6,20	0,82	1,73	788	3642	0,04	58,2	0,15	8,42	0,38	0,01	85,1	3131	137	16,2
	P25	10,4	1,53	2,23	957	4400	0,36	76,0	0,40	17,4	0,43	0,04	87,0	3212	144	17,8
	P75	15,9	2,24	3,71	1212	5624	0,89	106	1,16	34,9	0,86	0,07	101	3305	175	23,9
	P95	31,1	2,86	5,95	1376	6526	1,61	156	2,00	46,3	1,13	0,09	102	3329	195	26,0
Adenomatozna krv	sr.vrednost	12,4	0,64	31,7	626	1926	6,31	61,1	0,56	10,6	0,68	0,02	40,6	1864	1125	18,5
	st.dev.	4,60	0,23	8,70	102	241	1,90	9,40	0,24	3,80	0,32	0,01	1,97	185	113	1,83
	Min	5,80	0,30	20,8	450	1373	2,59	40,4	0,26	3,60	0,38	0,01	36,2	1180	1035	15,9
	Max	23,0	1,23	43,7	845	2507	9,04	76,0	1,28	16,9	1,31	0,03	57,7	2644	1396	28,9
	medijana	12,0	0,60	33,0	621	1926	6,80	62,1	0,53	9,98	0,56	0,01	40,6	1961	1135	18,2
	GM	11,6	0,61	30,7	618	1912	5,97	60,4	0,51	9,87	0,62	0,01	37,3	1980	1164	19,2
	P5	6,60	0,36	21,4	467	1584	2,98	40,9	0,26	4,33	0,39	0,01	39,3	1686	1029	16,4
	P25	9,50	0,48	23,3	574	1893	5,51	57,7	0,39	8,12	0,43	0,01	40,6	1827	1106	17,4
	P75	14,3	0,74	37,5	638	1941	7,44	65,5	0,62	13,2	0,88	0,02	47,2	2108	1248	20,6
	P95	20,2	1,01	42,8	795	2357	8,95	74,7	0,91	16,7	1,17	0,03	50,4	2450	1362	24,6
U—test	P—vrednost	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	>0,05

Uzorci kontrolne krvi imali su veće koncentracije esencijalnih Co, Cu, Zn, Se i toksičnih Pb i U u odnosu na uzorke adenomatozne krvi. Takođe, primećene su veće koncentracije makroelemenata Na i Ca u kontrolnim uzorcima krvi. U uzorcima krvi pacijenata obolelih od adrenalnih adenoma, zapažene su značajno povišene koncentracije Ni, As i K u odnosu na kontrolne uzorke krvi (slika 46).



**Slika 46.** Koncentracije mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima kontrolne krvi i adenomatozne krvi. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Uzorci pune krvi su, kao i kod adrenalnih tkiva, dalje razdvojeni na osnovu pola, godina, pušačkog statusa i veličine adrenalne mase ispitanika kako bi se uočile potencijalne razlike u koncentracijama elemenata.

**Tabela 12.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata (µg/g) u uzorcima kontrolne krvi, podeljene prema polu i godinama. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Žene	sr.vrednost	15,6	1,92	16,8	1055	4702	0,73	93,8	0,98	27,8	0,73	0,05	94,4	3253	163	22,8
	st.dev.	9,50	0,74	6,78	248	1260	0,44	28,5	0,61	12,1	0,33	0,03	7,01	77,3	20,6	3,21
	medjana	13,8	2,15	16,2	1089	4405	0,73	85,3	0,95	27,1	0,67	0,05	96,3	3278	161	23,9
Muškarci	sr.vrednost	14,3	1,81	16,4	1063	5472	0,64	92,9	0,78	25,5	0,74	0,05	95,7	3246	160	19,8
	st.dev.	5,81	0,53	6,72	165	668	0,60	29,1	0,58	12,7	0,41	0,03	6,56	68,5	19,9	3,22
	medijana	12,9	1,69	15,2	1001	5503	0,44	84,5	0,62	21,1	0,72	0,05	97,9	3243	158	19,0
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>
Ispod 55	sr.vrednost	15,8	1,88	16,9	1023	4697	0,66	87,1	0,82	26,6	0,65	0,05	95,5	3254	161	21,4
	st.dev.	7,9	0,57	3,76	175	694	0,47	27,0	0,44	10,4	0,23	0,03	6,5	73,8	20,6	3,51
	medjana	14,5	1,96	16,4	1001	4569	0,52	80,1	0,69	26,0	0,57	0,05	97,0	3280	157	22,2
Iznad 55	sr.vrednost	12,9	1,73	15,8	1112	5800	0,68	100,7	0,97	26,9	0,70	0,05	94,5	3239	160	20,7
	st.dev.	7,2	0,72	2,54	233	1139	0,62	29,5	0,77	14,9	0,44	0,03	6,92	66,6	19,5	3,48
	medijana	11,2	1,52	15,9	1111	5667	0,57	93,5	0,81	28,1	0,68	0,04	97,1	3245	156	20,6
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

U uzorcima kontrolne krvi uočena je značajna razlika u koncentracijama cinka na osnovu pola i godina (tabela 12). Preciznije, zapažena je povišena koncentracija cinka kod muškaraca i osoba starijih od 55 godina. Druge značajnosti u elementalnim profilima nisu zabeležene između grupa. Posmatrajući uzorke adenomatozne krvi, Cu i Cd bili su značajno povišeni kod žena u odnosu na muškarce, dok se koncentracije ostalih elemenata nisu značajno razlikovale između starosnih grupa (iznad 55 godina naspram ispod 55 godina) (tabela 13). Pušači iz kontrolne grupe imali su značajno veće koncentracije Pb i Cd u punoj krvi (Tabela 14), dok se u uzorcima adenomatozne krvi cink istakao sa povišenim koncentracijama kod ispitanika sa adrenalnim masama ispod 4 cm (Tabela 15). Nisu uočene značajne razlike između pušača i nepušača kod uzoraka pacijenata obolelih od adrenalnih adenoma (tabela 15).



**Tabela 13.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima adenomatozne krvi, podeljene prema polu i godinama. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0.05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Žene	sr.vrednost	12,8	0,67	30,5	656	1949	6,58	62,2	0,61	10,8	0,68	0,02	40,5	1838	1126	18,3
	st.dev.	4,5	0,24	6,89	98,2	274	1,96	9,6	0,26	3,67	0,34	0,01	2,32	216	40,3	2,13
	Medjana	12,0	0,60	29,8	629	1926	6,95	62,7	0,56	10,2	0,61	0,01	40,7	1887	1126	17,9
Muškarci	sr.vrednost	11,4	0,57	28,9	555	1872	5,68	58,5	0,42	10,1	0,64	0,02	40,9	1925	1123	19,0
	st.dev.	4,91	0,22	8,97	75,8	139	1,74	9,23	0,14	4,36	0,22	0,01	2,10	61,1	8,75	1,23
	Medijana	11,5	0,56	30,1	587	1920	6,16	61,5	0,39	9,9	0,59	0,01	40,8	1914	1125	19,2
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
< 55 godina	Sr vrednost	14,3	0,63	28,7	621	1974	6,08	63,1	0,61	9,36	0,55	0,02	40,6	1894	1123	18,9
	st.dev.	5,5	0,20	4,56	125	240	1,81	7,50	0,29	4,08	0,23	0,01	2,18	93,1	32,9	1,63
	medjana	14,1	0,58	29,0	625	1928	6,26	61,5	0,57	9,01	0,60	0,02	40,5	1898	1127	18,7
> 55 godina	sr.vrednost	10,5	0,64	30,1	630	1879	6,53	59,2	0,50	11,84	0,59	0,01	40,7	1834	1129	18,1
	st.dev.	2,4	0,27	5,43	79	245	2,05	11,0	0,18	3,19	0,34	0,005	1,92	249	36,0	2,12
	medijana	11,2	0,60	29,4	615	1917	6,95	62,6	0,48	11,67	0,57	0,01	41,0	1899	1125,3	18,0
U test	P vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Tabela 14.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata (µg/g) u uzorcima kontrolne krvi, podeljene prema konzumiranju duvana. Razlike između pušača i nepušača ispitane su Man-Vitni U —testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Nepušači	sr.vrednost	13,1	1,8	2,81	1033	5209	0,65	85,8	0,46	18,7	0,66	0,06	94,0	3251,1	164	21,7
	st.dev.	3,7	0,6	1,56	195	923	0,62	16,1	0,29	9,71	0,23	0,02	7,1	73,0	18,3	3,5
	Medjana	14,2	1,7	2,87	1043	5545	0,42	85,0	0,42	17,2	0,70	0,06	97,2	3280,3	163,4	22,3
Pušači	sr.vrednost	16,51	1,83	3,09	1097	5076	0,68	102	1,27	35,0	0,75	0,04	95,6	3250	159	20,9
	st.dev.	9,76	0,74	1,76	213	1166	0,42	34,7	0,52	9,43	0,34	0,03	6,33	71,5	21,2	3,66
	Medijana	12,88	1,83	2,99	1021	5159	0,73	97,6	1,15	34,1	0,73	0,04	96,9	3265	151	21,6
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Tabela 15.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata (µg/g) u uzorcima adenomatozne krvi, podeljene prema konzumiranju duvana i veličine nodula. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U —testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Nepušači	Sr vrednost	13,1	0,61	31,4	582	1964	6,97	60,2	0,47	11,65	0,58	0,02	40,9	1863	1107	18,1
	st.dev.	4,61	0,19	7,12	62,6	241	1,41	13,6	0,14	3,66	0,23	0,01	1,82	62,6	35,5	1,83
	medjana	12,0	0,59	30,1	603	1921	6,94	63,0	0,53	11,01	0,60	0,02	41,7	1882	1122	17,6
Pušači	sr.vrednost	12,0	0,66	33,9	655	1901	5,87	61,8	0,61	9,90	0,61	0,01	40,5	1865	1138	18,8
	st.dev.	4,71	0,26	10,3	115	248	2,10	5,81	0,29	3,86	0,20	0,01	2,13	239	27,0	1,91
	medijana	11,7	0,60	31,1	626	1926	6,66	62,1	0,54	9,93	0,60	0,01	40,5	1971	1126	18,5
U test	P vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Ispod 4cm	sr.vrednost	13,2	0,68	29,7	620	2004	6,86	64,9	0,57	10,91	0,63	0,02	40,7	1882	1126	19,0
	st.dev.	5,6	0,25	5,62	121	252	1,73	7,2	0,19	4,22	0,37	0,01	1,5	105	42,8	2,45
	medjana	11,7	0,61	27,6	625	1928	6,81	62,1	0,57	10,25	0,61	0,02	40,7	1909	1126	19,4
Iznad 4cm	sr.vrednost	11,3	0,57	31,2	621	1874	5,84	57,6	0,44	10,98	0,60	0,01	40,1	1800	1118	17,9
	st.dev.	2,9	0,21	5,23	71,5	101,1	2,05	11,8	0,16	2,93	0,34	0,01	2,12	286	22,1	1,05
	medijana	12,0	0,56	32,9	612,0	1913,9	6,91	63,1	0,40	10,87	0,59	0,01	40,3	1861	1125	17,7
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Rezultati elementalnog profilisanja pune krvi kontrolnih i adrenalnih ispitanika dalje su podvrgnuti Spearman-ovom testu u cilju sagledavanja korelacija među određivanim esencijalnim i toksičnim mikroelementima i makroelementima (tabele 16 i 17).

Rezultati Spearman-ove korelacije za uzorke adenomatozne krvi (tabela 16) ukazuju na svega nekoliko značajnosti. Nikl sa cinkom, kao i Cu sa Cd i Zn sa Cd pokazuju pozitivnu korelaciju, dok Se sa Ca pokazuju jedinu negativnu korelaciju. Najjača pozitivna korelacija uočena je između sadržaja Cd i Zn, a najslabija između Ni i cinka. Nisu zabeležene značajne korelacije mikroelemenata sa makroelemenima. Takođe, nisu uočene značajnosti među makroelementima.

Elementalna analiza uzoraka kontrolne krvi sa Spearman-ovom korelacijom (tabela 17) pokazala je nekoliko značajnih korelacija Cu, Co i Th sa drugim elementima. Najjača pozitivna korelacija zabeležena je između esencijalnog Cu i toksičnog Pb, dok je za Co i cink utvrđena negativna korelacija. Od analiziranih elemenata Cu se izdvojio sa najviše značajnih korelacija.

**Tabela 16.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u uzorcima adenomatozne krvi. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	0,420	0,197	0,328	0,486	-0,245	-0,047	0,425	0,064	0,184	0,348	-0,279	-0,247	0,179	-0,098
Co		1	-0,036	0,022	0,260	0,298	0,038	0,168	-0,175	-0,114	0,113	-0,083	-0,010	0,436	0,005
Ni			1	-0,078	<b>0,598</b>	-0,036	0,194	-0,035	-0,057	<b>0,602</b>	-0,347	0,016	-0,295	-0,183	0,188
Cu				1	0,300	-0,272	0,117	<b>0,606</b>	0,224	-0,023	0,253	-0,171	-0,099	0,116	-0,093
Zn					1	0,094	0,435	<b>0,629</b>	0,078	0,244	0,265	-0,354	-0,296	0,002	0,281
As						1	0,262	-0,156	-0,012	-0,048	0,054	0,277	0,203	-0,138	0,024
Se							1	0,072	-0,094	0,032	0,158	<b>-0,624</b>	-0,329	-0,098	0,062
Cd								1	0,280	-0,126	0,290	-0,093	0,015	0,429	0,267
Pb									1	0,184	0,209	0,284	-0,186	0,177	0,116
Th										1	-0,028	0,213	-0,186	0,001	-0,056
U											1	-0,101	-0,186	0,001	-0,055
Ca												1	0,320	0,099	0,088
Na													1	0,021	0,127
K														1	0,421
Mg															1

**Tabela 17.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u uzorcima kontrolne krvi. Statistički značajne p vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	0,214	0,118	0,127	0,065	<b>0,542</b>	0,060	0,108	0,074	-0,024	-0,069	0,112	0,263	0,150	<b>0,608</b>
Co		1	0,247	-0,118	<b>-0,586</b>	<b>0,507</b>	-0,091	0,034	-0,017	-0,029	0,061	0,228	0,358	0,087	-0,130
Ni			1	-0,172	-0,096	-0,003	-0,358	-0,170	-0,106	<b>0,534</b>	-0,178	0,064	0,110	-0,029	0,181
Cu				1	0,196	-0,190	<b>0,501</b>	<b>0,548</b>	<b>0,696</b>	<b>-0,539</b>	0,058	0,004	0,031	0,142	-0,068
Zn					1	-0,174	0,232	-0,090	-0,054	-0,139	0,218	-0,182	-0,347	0,143	0,078
As						1	-0,080	0,053	-0,056	0,004	0,072	0,031	0,258	-0,036	0,034
Se							1	0,263	0,174	-0,342	0,048	0,024	-0,203	0,104	-0,083
Cd								1	-0,159	-0,166	-0,164	0,167	0,097	-0,008	-0,044
Pb									1	-0,036	-0,280	0,131	0,136	-0,075	-0,063
Th										1	-0,166	0,089	0,013	-0,038	0,147
U											1	-0,108	-0,316	0,202	0,139
Ca												1	0,028	0,031	-0,184
Na													1	0,041	0,021
K														1	0,040
Mg															1

Rezultati dobijeni analizom uzoraka pune krvi kontrolne grupe u saglasnosti su sa koncentracijama makro- i mikroelemenata zabeleženim u literaturi (Kim i sar. 2018; Nisse i sar. 2017), osim za Se i Zn čije su koncentracije bile snižene u našoj populaciji u odnosu na druge studije (Ermakov i sar. 2010). Snižene koncentracije Se i Zn u kontrolnim uzorcima mogu se objasniti njihovim neadekvatnim unosom putem ishrane, usled prirodno niskih koncentracija ova dva elementa u zemljištu (Jagodić i sar. 2021). Naime, istraživanja su pokazala da su sadržaji Zn i Se značajno sniženi u širokom spektru prehrambenih proizvoda dostupnih na lokalnim pijacama i prodavnicama, uključujući i hleb, proizvode od pileline i svinjskog mesa u odnosu na koncentracije Zn i Se prijavljenim u drugim zemljama (Popović i sar. 2017; Đinović-Stojanović i sar. 2017). Uzimajući u obzir snižene koncentracije Se i Zn, uzorci kontrolne krvi koji su analizirani u ovoj studiji mogu biti posmatrani kao validna kontrolna grupa za našu populaciju.

Opsežnim pregledom literature utvrđeno je da elementalni profil uzoraka adenomatozne krvi nije ispitan, što daje pionirski značaj ovoj studiji. Utvrđeno je da su uzorci adenomatozne krvi imali snižene koncentracije Co, Cu, Zn i Se u poređenju sa uzorcima kontrolne krvi. Takođe, uzorci krvi pacijenata obolelih od adrenalnih adenoma su imali povišene koncentracije K i snižene Na i Ca u poređenju sa kontrolnim uzorcima krvi.

Snižena koncentracija Na u uzorcima adenomatozne krvi bila je u skladu sa rezultatima studije Diederich i saradnika, koji su ukazali na to da su snižene koncentracije Na karakteristične za osobe sa insuficijencijom nadbubrežne žlezde (Diederich i sar. 2003). Posmatrajući rezultate u disertaciji dobijene za toksične mikroelemente, primećeno je da su uzorci adenomatozne krvi imali povišene koncentracije As i snižene koncentracije Pb. Thang i sar. su istakli da As i Pb mogu imati negativan uticaj na lučenje kortizola, što nepovoljno utiče na funkciju nadbubrežne žlezde (Thang i sar. 2017).

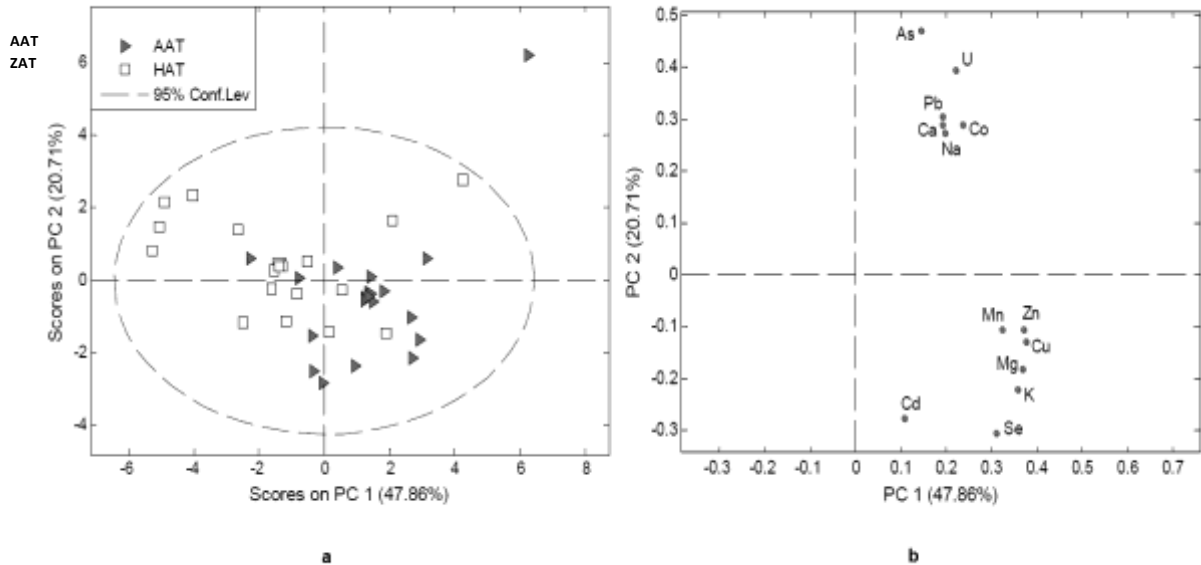
**Tabela 18.** Hormonski status kod pacijenata obolelih od adrenalnih adenoma

	Noradrenalin ng/L	Adrenalin ng/L	Dopamin ng/L	ACTH pmol/L	Kortizol nmol/L	Aldosteron pmol/L
<b>Srednja vrednost</b>	128	15,2	504	13,2	660	245
<b>Standardna devijacija</b>	130	20,6	474	3,87	206	285
<b>Minimum</b>	15,4	1,72	163	9,26	396	37,8
<b>Maksimum</b>	277	45,9	1195	17,0	901	571
<b>Medjana</b>	111	6,64	328	13,2	672	126
<b>Geometrijska sredina</b>	66,6	7,43	373	12,7	634	140
<b>P5</b>	16,6	2,10	174	9,65	435	46,6
<b>P25</b>	21,4	3,64	217	11,2	592	82,2
<b>P75</b>	218	18,2	614	15,1	741	348
<b>P95</b>	265	40,3	1079	16,6	868	526
<b>IQR</b>	196	14,6	397	3,87	149	266
<b>REFERENTNE VREDNOSTI HORMONA</b>						
	Noradrenalin ng/L	Adrenalin ng/L	Dopamin ng/L	ACTH pmol/L	Kortizol nmol/L	Aldosteron pmol/L
<b>Referentni opseg</b>	70—1700	0—140	0—30	1,6 – 13,9	140 – 690	190—830

U tabeli 18 prikazane su vrednosti deskriptivne statistike i odabranih percentila zajedno sa interkvartalnim opsegom (eng. interquartile range, IQR) za hormone noradrenalin, adrenalin, dopamin, ACTH, kortizol i aldosteron pacijenata sa AA. Takođe, u tabeli 18 su prikazane referentne vrednosti navedenih hormona. Može se uočiti da je dopamin povišen u odnosu na referentne vrednosti, dok su ostali hormoni u referentnim granicama.

Na dobijene rezultate takođe je primenjena multivarijantna analiza u cilju dodatne interpretacije podataka. Analiza glavnih komponenti primenjena je u cilju smanjivanja dimenzionalnosti podataka, otkrivanja potencijanih trendova između njih i definisanja karakterističnih markera (elemenata) odgovornih za određenu klasifikaciju. Analiza glavnih komponenti je statistička metoda koja izračunava novi koordinatni sistem sačinjen od latentnih varijabli (glavne komponente) koje su međusobno pod pravim uglom. Glavne komponente imaju ulogu u opisivanju maksimalne varijacije unutar podataka.

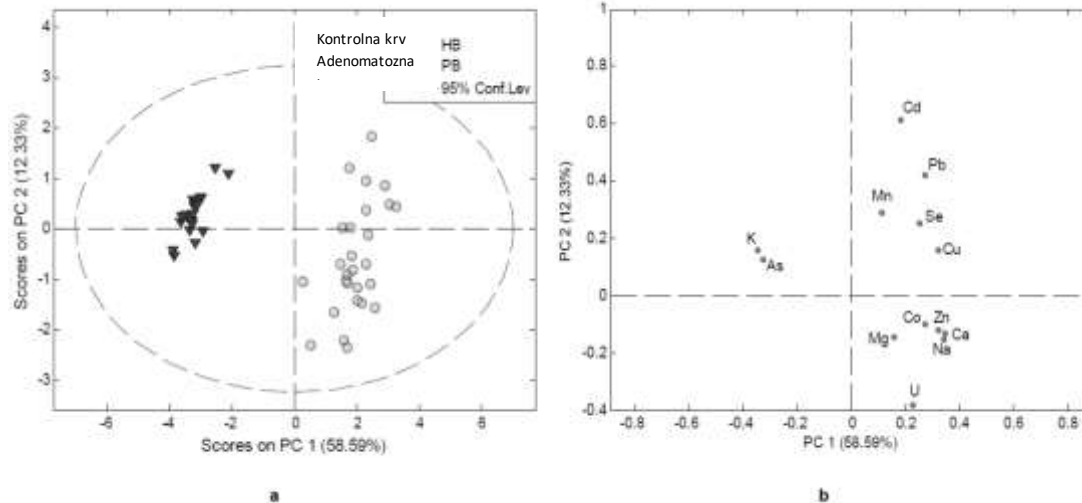
Na razdvajanje duž ose uglavnom utiču promenljive koje su pozicionirane daleko od nule (posmatrajući vertikalni i horizontalni pravac), dok se promenljive pozicionirane blizu nule ne smatraju statistički značajnim.



Slika 47. PCA za uzorke ZAT i AAT

Na slici 47 prikazana je PCA za klasifikaciju ZAT i AAT uzoraka na osnovu koncentracija elemenata, dok je na Slici 48 prikazana PCA za uzorke pune krvi.

Dobijeni PCA model za uzorke adrenalnih tkiva (slika 47) sastoji se od četiri glavne komponente koje sadrže 83,01% informacija o varijabilitetu koncentracija elemenata. Prva komponenta (PC1) obuhvata 47,86% ukupnog varijabiliteta podataka, dok druga komponenta (PC2) čini 20,71%. Grafik 47a ukazuje na dve grupe koje se delimično preklapaju (ZAT i AAT uzorci). Iz grafika prikazanog na slici 47b može se zaključiti da su Mn, Cu, Zn, Se, K i Mg elementi koji razdvajaju AAT uzorke od ZAT. Interesantno je istaći da je jedan uzorak koji pripada AAT grupi izvan nivoa pouzdanosti (0,95). Uočava se da su koncentracije Co, As, Cd, U, Ca i Na bile slične u ZAT i AAT uzorcima, što implicira da pomenuti elementi nisu značajni u razdvajanju ovih uzoraka adrenalnog tkivnog materijala.



Slika 48. PCA za uzorke kontrolne krvi i adenomatozne krvi

Analiza glavnih komponenti za uzorke adenomatozne krvi i kontrolne krvi (slika 48) obuhvata četvorokomponentni model koji pokriva 84,95% ukupnog varijabiliteta podataka. PC1 obuhvata 58,59% ukupnog varijabiliteta podataka, dok PC2 čini 12,33%. Grafik 48a ukazuje na postojanje dve grupe, koje se jasno razlikuju duž pravca PC1. Na desnoj strani grupisani su uzorci kontrolne krvi, dok su uzorci adenomatozne krvi na levoj strani. Sa grafika 48b može se uočiti da su Mn, Mg i Cd bili blizu nule, što ukazuje na njihov mali doprinos duž PC1 pravca. Takođe, uočava se da su K i As imali najveće negativne vrednosti duž PC1, čime se izvodi zaključak da su zastupljeniji u uzorcima adenomatozne krvi. Co, Cu, Zn, Se, Pb, U, Ca i Na su pokazali najveću pozitivnu vrednost duž PC1 i odredili grupisanje uzoraka kontrolne krvi. Rezultati dobijeni primenom PCA su u skladu sa Man-Vitni U-testom.

## 4.2. Feohromocitomi

### 4.2.1. Adrenalni tkivni materijal

U tabeli 19. navedeni su parametri deskriptivne statistike i odabrani percentili za sve analizirane elemente u PCC uzorcima zajedno sa značajnim vrednostima dobijenim Mann-Whitney U-testom.

Raspodela mikroelemenata i makroelemenata u analiziranim uzorcima prikazana je na slici 49.

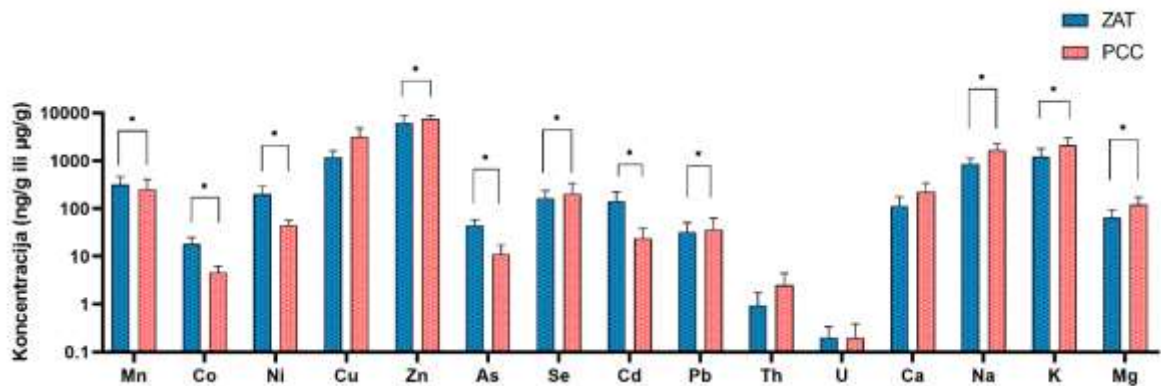


**Tabela 19.** Parametri deskriptivne statistike i odabrani percentili za količine mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata (µg/g) u uzorcima PCC. Razlike između PCC i ZAT ispitane su neparametrijskim Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Na	Mg	K	Ca
PCC	mean	251	4,65	44,5	3189	7626	11,2	204	23,5	36,3	2,51	0,20	1681	120	2126	225
	st.dev.	159	1,54	12,1	1599	1130	6,10	134	14,9	26,7	1,92	0,19	614	53,2	899	119
	min	84,1	2,21	28,3	1648	5932	5,12	113	7,27	8,65	0,12	0,02	867	51,3	872	81,8
	max	542	7,89	67,6	6362	10244	24,1	589	49,0	90,6	5,86	0,58	2720	187	3180	409
	median	250	4,45	44,3	2742	7625	10,9	159	18,2	35,6	2,43	0,10	1466	121	2156	232
	GM	207	4,31	43,1	2875	7754	9,98	181	19,4	27,6	1,65	0,10	1576	107	1906	193
	P5	90	2,84	29,4	1688	6106	5,13	126	8,04	9,33	0,30	0,02	867	51,3	872	82,1
	P25	104	3,60	38,07	2031	7230	6,64	142	11,9	14,2	1,12	0,05	1217	66,0	1200	106
	P75	308	5,37	46,98	3843	8011	13,1	188	35,0	48,6	3,32	0,20	2121	172	2933	318
	P95	523	6,81	65,23	5985	9297	21,7	426	46,8	79,7	5,61	0,58	2720	187	3180	407
U—test	P—value	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05

Najzastupljeniji mikroelement u PCC uzorcima bio je Zn (tabela 19), zatim Cu, Mn, Se, Pb, Cd, As, Co, Th i na kraju U. Kod ZAT uzoraka uočena je slična raspodela, sa izuzetkom Cd, As i Pb. Raspodela koncentracija makroelemenata bila je ista u PCC i ZAT uzorcima.

Man-Vitni U test pokazao je da uzorci PCC imaju značajno povišene koncentracije Zn, Se, Na, K i Mg, ali snižene koncentracije Mn, Co, Pb i As od kontrolnih uzoraka tkiva.



Slika 49. Koncentracije mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima ZAT i PCC. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Rezultati dobijeni za PCC uzorke dodatno su razdvojeni na osnovu pola (žene naspram muškaraca), starosti ( $\leq 50$  naspram  $\geq 50$  godina, u skladu sa srednjom vrednošću godina pacijenata), konzumiranja duvana (pušači naspram nepušača) i veličine tumorske promene ( $\leq 5$  cm naspram  $\geq 5$  cm). Rezultati statističke analize prikazani su u tabelama 20 i 21.

Uzorci PCC tkiva žena imali su značajno povišene koncentracije esencijalnog Se kao i toksičnih Pb i Cd u odnosu na PCC tkiva muškaraca. Zanimljivo je uočiti da se ni jedan element nije izdvojio kao statistički značajan u razdvajanju prema starosnim grupama (tabela 20).

Mangan i Cu bili su značajno povišeni u PCC uzorcima pušača u odnosu na nepušače. Ovi mikroelementi, pored Ni, bili su takođe značajno povišeni kod pacijenata sa tumorskim promenama ispod 5 cm (tabela 21). S druge strane, makroelementi nisu pokazali statističke značajnosti u koncentracijama između ispitivanih grupa.

**Tabela 20.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata (µg/g) u uzorcima PCC, podeljenih prema polu i godinama. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Žene	sr.vrednost	289	5,11	43,8	3493	7860	11,7	253	22,7	53,6	1,79	0,19	226	1679	2136	125
	st.dev.	91,8	1,72	14,4	1728	1478	5,09	174	15,4	17,9	0,96	0,20	104	568	856	56,4
	Medjana	273	5,14	41,7	3487	7525	11,1	168	20,9	55,3	1,72	0,12	238	1456	2174	126
Muškarci	sr.vrednost	285	4,10	45,1	3635	7432	10,7	162	15,9	21,91	1,68	0,18	220	1684	2145	130
	st.dev.	87,4	1,07	11,2	1378	606	6,66	49,1	7,88	11,62	0,69	0,17	96,7	654	976	45,9
	medijana	270	4,21	44,7	3417	7491	9,32	150	15,3	20,13	1,40	0,11	227	1503	2161	131
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Ispod 50	Sr vrednost	234	4,65	45,4	2624	7781	9,87	158	16,5	29,7	1,78	0,18	248	1787	2230	134
	st.dev.	148	1,01	12,5	934	1268	4,76	25,9	14,2	18,5	1,24	0,14	89,7	899	698	45,5
	Medjana	250	4,68	44,7	2091	7354	8,81	159	12,7	19,6	1,75	0,10	249	1873	2228	145
Iznad 50	sr.vrednost	291	4,42	43,9	2761	7511	11,9	150	17,2	26,2	1,54	0,19	255	1809	2245	140
	st.dev.	152	1,93	12,9	914	665	7,28	18,3	12,3	19,8	1,02	0,16	103	896	765	55,2
	medijana	254	4,12	42,6	2742	7628	10,9	146	12,9	16,9	1,67	0,12	258	1887	2241	143
U test	P vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Tabela 21.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata (µg/g) u uzorcima PCC, podeljenih prema konzumiranju duvana i veličine tumorske promene. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Nepušači	sr,vrednost	97,8	4,65	46,5	1855	7371	7,27	210	20,6	31,7	2,48	0,12	237	1542	2187	119
	st,dev,	2,14	1,62	12,3	395	809	1,43	155	16,5	21,9	2,13	0,11	154	874	890	32,4
	medjana	96,5	4,42	44,6	1852	7625	8,03	161	17,6	35,6	2,45	0,12	240	1413	2182	123
Pušači	sr,vrednost	285	4,56	42,7	3485	8776	6,94	196	18,9	36,9	2,79	0,14	231	1573	2176	112
	st,dev,	156	1,08	7,4	1625	1607	1,45	144	1,52	26,6	2,18	0,12	97,6	798	789	23,4
	medijana	254	4,51	40,7	3149	8769	6,90	175	18,4	36,3	2,63	0,14	233	1498	2169	120
U—test	P—vrednost	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<5 cm	Sr vrednost	282	4,74	51,0	3209	7869	11,6	194	23,0	39,4	2,18	0,06	233	1709	2153	127
	st,dev,	209	0,83	11,2	1792	927	5,91	70,9	17,1	18,6	1,67	0,04	67,9	685	675	57,9
	medjana	225	4,72	44,7	3179	7751	12,1	159	17,6	37,1	2,75	0,06	239	1734	2158	128
> 5cm	sr,vrednost	214	4,42	36,8	3141	8258	11,3	228	23,9	33,8	2,21	0,08	224	1732	2164	134
	st,dev,	76	1,99	8,5	1541	1039	3,39	179	14,6	17,5	1,48	0,07	109	876	786	65,8
	medijana	249	3,87	35,2	2147	8011	10,1	165	18,9	30,4	2,81	0,08	228	1725	2169	130
U test	P vrednost	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Tabela 22.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u uzorcima PCC. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	0,032	<b>0,624</b>	<b>0,781</b>	0,281	-0,032	0,378	0,499	-0,136	0,273	0,382	0,055	-0,064	0,358	0,165
Co		1	-0,178	-0,004	<b>-0,587</b>	0,475	0,200	0,269	0,460	-0,241	0,282	<b>0,655</b>	<b>0,664</b>	0,494	0,466
Ni			1	0,310	0,018	0,178	0,054	0,176	-0,323	-0,137	0,159	-0,347	-0,476	0,195	0,048
Cu				1	0,364	-0,023	<b>0,656</b>	<b>0,578</b>	0,102	0,254	0,536	-0,069	-0,087	0,372	0,060
Zn					1	<b>-0,824</b>	0,268	0,232	-0,181	0,436	-0,172	-0,307	-0,389	-0,417	-0,536
As						1	0,176	0,004	0,433	<b>-0,606</b>	0,346	0,025	0,103	0,431	0,471
Se							1	<b>0,675</b>	<b>0,615</b>	0,064	0,414	-0,064	-0,037	0,450	0,221
Cd								1	0,494	-0,086	0,214	0,352	0,324	0,526	0,462
Pb									1	-0,427	0,418	0,256	0,303	0,229	0,183
Th										1	0,027	0,083	0,046	-0,146	-0,128
U											1	0,183	0,137	0,294	0,064
Ca												1	<b>0,972</b>	0,453	0,514
Na													1	0,482	<b>0,639</b>
K														1	<b>0,898</b>
Mg															1

Spearman-ova korelacija (tabela 22) je primenjena u cilju utvrđivanja potencijalno značajnih korelacija između određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima.

Spearman-ova analiza ukazala je na svega nekoliko značajnih korelacija među elementima. Najjača pozitivna korelacija uočena je između Ca i Na, zatim između K i Mg, a najslabiju pozitivnu korelaciju pokazali su Cu i Cd. Spearman-ovom analizom dobijene su samo tri značajne negativne korelacije, od kojih je Zn sa As pokazao najjaču negativnu korelaciju, koju slede As sa Th i na kraju Zn sa Co.

Rezultati ove disertacije su prvi put prikazali elementalni status PCC uzoraka. Uočene su više koncentracije Zn i Se, kao i niži Mn i Co u PCC uzorcima u poređenju sa kontrolnim uzorcima.

Mangan je prepoznat kao jedan od regulatora nadbubrežne steroidogeneze (Raza i sar. 2005). Nakada i saradnici utvrdili su da PCC tkiva imaju sniženu aktivnost Mn-SOD (Nakada i sar. 1987). Rezultati ove disertacije ukazali su na nižu koncentraciju Mn u PCC uzorcima, što bi moglo da implicira pojačan oksidativni stres. Osim što može imati pozitivno dejstvo na rad nadbubrega, u literaturi je takođe zabeleženo da Mn oštećuje mitohodrije PC12 ćelija (ćelijske linije dobijene iz PCC nadbubrega), tako što redukuje adenozin-trifosfat (ATP), što za posledicu ima nekrozu i smrt ćelije (Roth i sar. 2002). Štaviše, Vescovi i saradnici su uočili da Mn može izazvati smanjenje nivoa dopamina i pri niskim koncentracijama (Vescovi i sar. 1991).

Literaturni podaci ukazuju da Co promovise apoptozu PC12 ćelija (Yang i sar. 2020), ali se ne može izostaviti njegov uticaj na stvaranje ROS (Kotake i sar. 2007). Uloga Co u patogenezi oboljenja nadbubrega još uvek nije dovoljno istražena, stoga, dalja istraživanja su neophodna kako bi se bolje razumela njegova potencijalna uloga u patogenezi adrenalnih oboljenja. U PCC tkivima uočene su povišene koncentracije Zn u odnosu na uzorke ZAT, što bi moglo da implicira pojačan oksidativni stres. Toksičan efekat povišenog Zn na PC12 ćelije zabeležen je u dve studije (Sánchez-Martín i sar. 2010; Ren i sar. 2014). Sanchez-Martin i saradnici potvrdili su nekrozu izazvanu višim koncentracijama Zn u PC12 ćelijama. Ovaj proces bio je praćen prekomernom generacijom ROS-a. Prema rezultatima Abe i saradnika, Zn takođe podstiče apoptozu PC12 ćelija. Štaviše, uočili su da Zn može uticati i na povećanje koncentracije Ca i doprineti mitohondrijalnoj disfunkciji (Abe i sar. 2006). Zabeleženo je da Se smanjuje učestalost apoptoze u PC12 ćelijama (Nishina i sar. 2007). S druge strane, Nakada i saradnici su utvrdili da se aktivnost enzima Cu/Zn—SOD suštinski ne razlikuje između PCC tkiva i kontrola (Nakada i sar.1987). Rezultati prikazani u ovom istraživanju nisu izdvojili Cu statistički značajnim mikroelementom u razdvajanju uzoraka PCC od uzoraka ZAT.

Zanimljivi nalazi u disertaciji dobijeni su za Pb i As, čije su koncentracije bile statistički niže u PCC uzorcima u odnosu na ZAT. Sanders i saradnici primetili su da Pb može doprineti oksidativnom stresu i izazvati citotoksičnost i genotoksičnost PC12 ćelija (Sanders i sar. 2014). Štaviše, izloženost Pb može izazvati značajne promene u koncentracijama glutamata i dopamina (Sanders i sar. 2014). Prema Schaefer i saradnicima, Pb ima uticaj na suzbijanje lučenja noradrenalina u ćelijama nadbubrega (Schaefer i sar. 1994). Istraživanje Tokar i saradnika ukazalo je da As može doprineti nastanku oboljenja nadbubrežne žlezde (Tokar i sar. 2014). Izlaganje Cd takođe može prouzrokovati oštećenje PC12 ćelija (Sanders i sar. 2014; Gerspacher i sar. 2009). Iako su rezultati prikazani u ovom istraživanju ukazali na niže koncentracije Cd u PCC uzorcima, zanimljivo je istaći da razlika između PCC i ZAT uzoraka nije bila statistički značajna, posebno pri razdvajanju učesnika prema konzumiranju duvana.

Niže koncentracije Pb, As i Cd u PCC uzorcima mogle bi biti posledica dugoročnog akumuliranja ovih elemenata u ZAT. S obzirom na to da PCC nije prisutan tokom celog života pacijenta, nego se javi u određenom životnom dobu, verovatno da PCC u tom vremenskom opsegu od nastanka nije mogao da dostigne koncentracije Pb, As i Cd koje su prisutne u kontrolnom adrenalnom tkivnom materijalu.

Uzorci PCC imali su povišene koncentracije K, Mg i Na u poređenju sa ZAT uzorcima. Sanders i saradnici uočili su uticaj Mg na oksidativni stres, citotoksičnost i genotoksičnost PC12 ćelija (Sanders i sar. 2014). Uočeno je da Mg smanjuje oslobađanje kateholamina i da takođe deluje antagonistično na rad Na/K-ATPazne pumpe. Ova svojstva Mg, koja izazivaju direktni vazodilatatorni efekat, korisna su za snižavanje najčešće oscilatorno povišenog krvnog pritiska, koji česta klinička prezentacija kod pacijenata sa PCC (James i Cronjé 2004). Prema Abeu i saradnicima, joni Zn mogu izazvati depolarizaciju ćelijske membrane, što zauzvrat utiče na inhibiciju K kanala (Abe i sar. 2006). Porast koncentracije K utiče na lučenje aldosterona na dva načina: preko osovine RAAS ili direktnom sekrecijom aldosterona iz ćelija kore nadbubrežne žlezde (Fountain i Lappin 2021). Iako su PCC uzorci imali više koncentracije Ca, nije bilo statistički značajne razlike između PCC i ZAT uzoraka. Dobijeni rezultati za koncentracije makroelemenata u PCC uzorcima potencijalno mogu biti posledica povećane zapremine ćelija u ovom tkivu u odnosu na ZAT (Marino-Enriquez i Fletcher 2014).

#### **4.2.2. Puna krv**

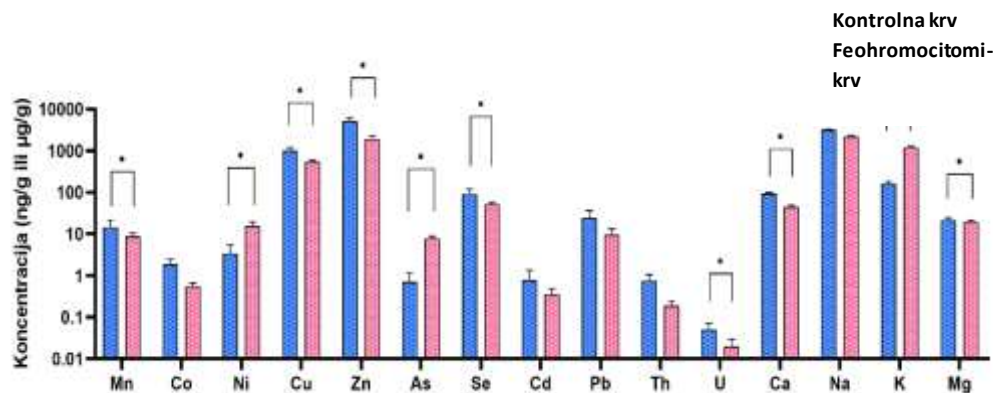
U tabeli 23 prikazani su rezultati elementalne analize pune krvi pacijenata obolelih od PCC. Zastupljenost esencijalnih i toksičnih mikroelemenata, sa izuzetkom As, Co i Cd u uzorcima krvi pacijenata i kontrolne grupe je slična. Kontrolni uzorci imali su više koncentracije Co i Cd, dok je As bio povišen u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC.

Uzorci krvi pacijenata obolelih od PCC pokazali su različite distribucije makroelemenata u odnosu na kontrolnu grupu: Na je bio najzastupljeniji, zatim K, Ca i Mg. U poređenju sa uzorcima kontrolne krvi, uzorci krvi pacijenata sa PCC imali su značajno više koncentracije Na, K i Ca i značajno niže koncentracije Mn, Cu, Zn, Se i Mg. Slika 50 prikazuje koncentracije određivanih elemenata u uzorcima pune krvi kontrolne grupe i pune krvi pacijenata obolelih od PCC.

**Tabela 23.** Parametri deskriptivne statistike i odabrani percentili za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC. Razlike između uzoraka krvi pacijenata obolelih od PCC i kontrolne krvi ispitane su Man-Vitni U -testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Na	Mg	K	Ca
Sr vrednost	8,69	0,54	15,4	544	1938	7,75	51,7	0,35	9,58	0,09	0,02	2219	19,6	1188	45,0
st.dev.	1,81	0,12	4,20	59,9	335	1,13	5,87	0,13	3,50	0,05	0,01	130	1,96	88,9	3,75
Min	7,04	0,48	10,4	497	1591	7,03	46,1	0,18	6,84	0,03	0,01	1938	17,4	1092	41,0
Max	10,8	0,62	23,1	629	2938	9,34	59,7	0,45	14,6	0,16	0,02	2216	21,7	1278	50,1
Medijana	8,32	0,51	14,2	525	1898	7,22	50,4	0,20	8,23	0,08	0,02	2160	19,6	1192	44,4
GM	8,49	0,53	14,9	541	1917	7,65	51,4	0,24	9,07	0,08	0,02	2115	19,5	1186	44,9
P5	7,06	0,49	11,0	499	1601	7,10	47,1	0,18	6,98	0,04	0,01	1964	17,6	1098	41,4
P25	7,23	0,50	13,4	504	1732	7,12	48,3	0,19	7,69	0,05	0,01	2066	18,3	1124	43,2
P75	9,71	0,54	17,6	566	2104	7,83	53,7	0,27	10,1	0,11	0,02	2212	20,9	1255	46,5
P95	10,6	0,60	21,1	616	2316	9,04	58,5	0,41	13,7	0,15	0,02	2216	21,6	1273	49,2
U—test	P—vrednost	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>





**Slika 50.** Koncentracije mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima kontrolne krvi i krvi pacijenata obolelih od PCC. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0,05$ ) i \*\* ( $P < 0,01$ ).

Rezultati elementalnog statusa uzoraka krvi pacijenata obolelih od PCC u zavisnosti od pola, godina života, konzumiranja duvana i veličine tumorske promene prikazani su u tabelama 24 i 25. Primenom Man-Vitni U testa nije se izdvojio ni jedan element kao statistički značajan između žena i muškaraca, kao ni između starosnih grupa (tabela 24).

**Tabela 24.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC, podeljenih prema polu i godinama života. Razlike između grupa ispitane su neparametrijskim Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ).

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Na	Mg	K	Ca
Žene	sr.vrednost	20,0	0,94	16,9	781	2881	5,41	56,7	0,83	8,45	1,22	0,01	2159	18,6	1184	46,0
	st.dev.	9,85	0,42	6,07	70,8	596	1,76	7,22	0,25	1,38	0,59	0,01	136	1,45	101	4,73
	medjana	25,6	1,16	18,5	811	3070	6,14	60,5	0,71	7,66	1,47	0,02	2098	18,9	1135	43,0
Muskarci	sr.vrednost	13,5	0,66	13,9	687	2605	4,10	55,3	0,46	10,6	1,21	0,01	2206	20,1	1175	49,7
	st.dev.	4,09	0,32	0,87	82,2	364	1,24	12,0	0,41	2,20	0,56	0,01	120	1,62	73,8	8,41
	medijana	11,5	0,48	13,4	642	2770	3,44	60,5	0,25	11,1	0,90	0,02	2211	19,4	1186	48,9
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Ispod 55	Sr vrednost	16,0	0,72	15,6	704	2802	4,31	55,3	0,72	9,78	1,14	0,02	2101	19,1	1150	44,2
	st.dev.	8,37	0,41	2,60	110	588	1,59	12,0	0,28	1,45	0,44	0,02	89,6	2,02	89,7	5,23
	medjana	11,5	0,48	14,9	642	2858	3,44	60,5	0,85	10,0	0,90	0,02	2112	18,7	1145	44,0
Iznad 55	sr.vrednost	17,5	0,88	15,2	764	2685	5,21	56,7	0,91	9,28	1,29	0,02	2195	18,5	1165	47,6
	st.dev.	8,59	0,38	6,10	57,9	435	1,67	7,22	0,23	2,83	0,67	0,01	101	1,83	93,5	7,62
	medijana	18,2	1,03	13,4	782	2770	5,53	60,4	0,94	7,66	1,47	0,02	2207	19,8	1171	48,7
U test	P vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Tabela 25.** Parametri deskriptivne statistike za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC, podeljeni prema konzumiranju duvana i veličine tumorske promene. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Nepušači	sr.vrednost	18,4	0,83	17,2	731	2869	4,90	56,8	0,69	9,25	1,22	0,02	2151	17,6	1175	43,2
	st.dev.	8,41	0,40	3,82	105	498	1,76	10,2	0,38	1,59	0,39	0,02	123	1,55	98,5	5,33
	medjana	18,5	0,82	16,7	727	2964	4,79	60,8	0,59	9,13	1,19	0,02	2081	18,1	1164	46,2
Pušači	sr.vrednost	13,4	0,74	11,9	741	2492	4,47	55,1	0,80	10,5	1,21	0,02	2145	19,2	1175	43,4
	st.dev.	6,76	0,41	2,33	58,4	394	1,51	8,62	0,19	3,47	0,92	0,01	124	1,82	83,6	9,51
	medijana	13,2	0,78	11,7	738	2498	4,61	54,4	0,83	10,1	1,20	0,02	2201	19,9	1171	48,2
U—test	P—vrednost	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<5 cm	Sr vrednost	20,7	0,94	18,5	762	3096	5,42	61,8	0,69	8,64	1,33	0,02	2093	19,2	1143	45,1
	st.dev.	8,61	0,41	3,52	104	252	1,74	1,74	0,44	1,24	0,40	0,01	179	3,12	79,4	6,12
	medjana	25,6	1,16	18,4	811	3070	6,14	61,1	0,71	8,22	1,47	0,02	2032	19,1	1155	42,1
> 5cm	sr.vrednost	12,8	0,66	12,3	707	2391	4,09	50,2	0,60	10,4	1,10	0,02	2089	19,5	1153	46,7
	st.dev.	4,91	0,32	1,89	72,4	329	1,25	9,57	0,37	2,52	0,68	0,02	98,3	1,41	43,2	2,19
	medijana	11,5	0,48	13,4	700	2213	3,40	48,3	0,67	11,1	0,90	0,02	2091	19,5	1151	47,0
U test	P vrednost	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Nisu zabeležene statistički značajne razlike između pušača i nepušača u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC, dok su Ni i Zn bili značajno nižih koncentracija kod pacijenata sa tumorskim promenama većeg prečnika (tabela 25).

Spirmanova korelacija (tabela 26) ukazala je na mnogobrojne jake pozitivne, ali i negativne korelacije među elementima u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC, posebno između makroelemenata i mikroelemenata, što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim analizom adrenalnog tkivnog materijala sa PCC. Najjača pozitivna korelacija uočena je između Mn i Ni, a najslabija između Mn i Th. Negativna korelacija, koja se istakla kao najjača, bila je između Zn i Ca, dok se najslabijom pokazala korelacija Ca sa Mg.

**Tabela 26.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u uzorcima krvi pacijenata obolelih od PCC. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	0,401	<b>0,988</b>	0,395	0,218	0,413	0,424	0,418	0,399	0,426	<b>0,761</b>	-0,398	<b>0,790</b>	-0,394	-0,385
Co		1	0,421	-0,443	0,388	<b>0,915</b>	<b>0,903</b>	-0,429	<b>0,602</b>	0,394	0,218	-0,412	0,207	0,429	0,418
Ni			1	0,387	0,212	0,437	0,399	0,405	0,416	0,402	<b>0,783</b>	-0,417	<b>0,804</b>	-0,431	-0,422
Cu				1	<b>-0,809</b>	<b>-0,621</b>	-0,365	<b>0,905</b>	0,381	<b>-0,683</b>	0,021	<b>0,631</b>	0,024	<b>-0,953</b>	<b>-0,961</b>
Zn					1	<b>0,845</b>	<b>0,796</b>	<b>-0,783</b>	0,036	<b>0,828</b>	0,308	<b>-0,849</b>	0,382	<b>0,848</b>	<b>0,836</b>
As						1	0,393	<b>-0,635</b>	-0,491	<b>0,953</b>	<b>0,837</b>	<b>-0,968</b>	<b>0,786</b>	<b>0,636</b>	<b>0,599</b>
Se							1	-0,401	<b>0,639</b>	0,427	0,249	-0,416	0,241	0,362	0,373
Cd								1	0,405	<b>-0,639</b>	0,022	<b>0,625</b>	0,031	<b>-0,937</b>	<b>-0,925</b>
Pb									1	-0,432	-0,219	0,436	-0,241	-0,403	-0,382
Th										1	<b>0,795</b>	<b>-0,943</b>	<b>0,785</b>	<b>0,639</b>	<b>0,593</b>
U											1	<b>-0,848</b>	<b>0,952</b>	0,011	0,028
Ca												1	<b>-0,834</b>	<b>-0,600</b>	<b>-0,583</b>
Na													1	0,034	0,031
K														1	<b>0,897</b>
Mg															1

**Tabela 27.** Hormonski status pacijenata obolelih od PCC

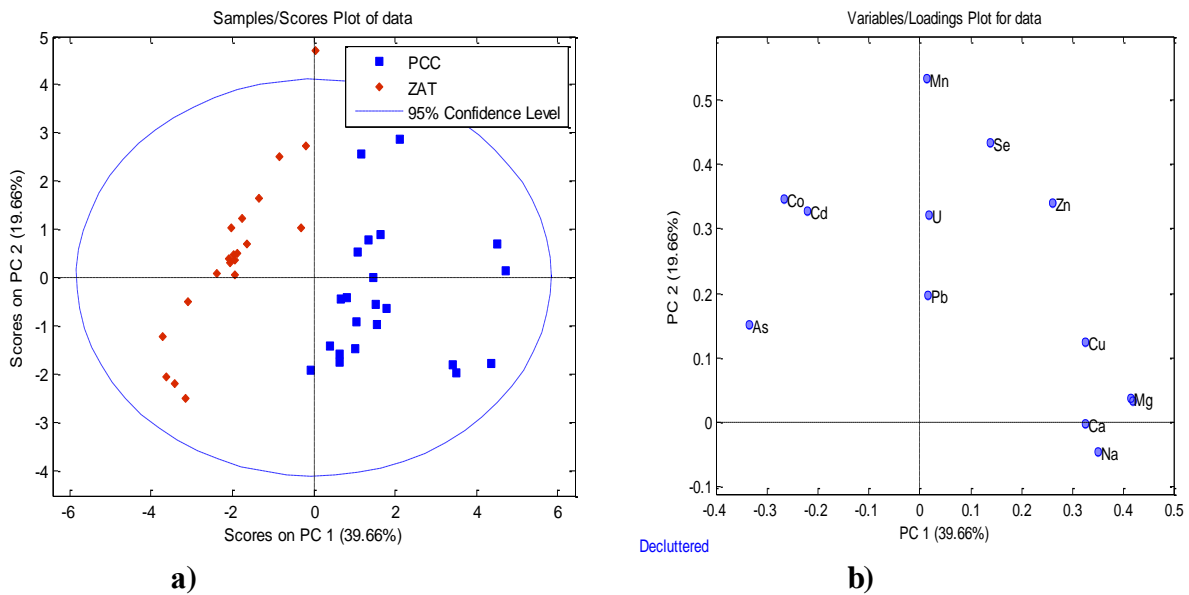
	Noradrenalin ng/L	Adrenalin ng/L	Dopamin ng/L	ACTH pmol/L	Kortizol nmol/L	Aldosteron pmol/L
<b>Mean</b>	840,63	310,73	1546,67	8,95	452,35	249,95
<b>St dev</b>	635,35	293,31	800,57	3,71	118,88	187,31
<b>Min</b>	61,40	20,10	731,60	5,10	317,80	117,50
<b>Max</b>	1849,00	837,50	2964,00	13,90	613,00	382,40
<b>Median</b>	746,30	214,80	1631,00	8,40	443,15	249,95
<b>Geomean</b>	562,24	190,07	1378,88	8,39	437,82	211,97
<b>P5</b>	131,93	47,37	770,21	5,48	317,85	130,75
<b>P25</b>	311,50	129,35	879,05	6,98	348,50	183,73
<b>P75</b>	1311,55	422,00	1871,00	10,38	545,83	316,18
<b>P95</b>	1717,75	762,05	2689,20	13,20	604,50	369,16
<b>IQR</b>	1250,15	401,9	1139,4	5,275	228,025	198,675
<b>REFERENTNE VREDNOSTI HORMONA</b>						
	Noradrenalin ng/L	Adrenalin ng/L	Dopamin ng/L	ACTH pmol/L	Kortizol nmol/L	Aldosteron pmol/L
<b>Referentni opseg</b>	70—1700	0—140	0—30	1,6 – 13,9	140 – 690	190—830

U tabeli 27. predstavljene su vrednosti hormonskog statusa pacijenata obolelih od PCC. Evidentno je da su svi pacijenti imali višak kateholamina, dok su ostali hormoni nadbubrežne žlezde bili su u referentnim granicama.

Elementalni status krvi pacijenata obolelih od PCC do sada nije publikovan u literaturi. Rezultati ove studije ukazuju da su se mikroelementi Mn, Cu, Zn i Se i svi analizirani makroelementi pokazali značajnim u razdvajanju uzoraka krvi pacijenata obolelih od PCC od kontrolnih uzoraka krvi. Koncentracije Mn, Cu, Zn, Se, i Mg bile su niže u krvi pacijenata sa PCC, dok su koncentracije Na, K i Ca bile više u poređenju sa kontrolnim uzorcima krvi.

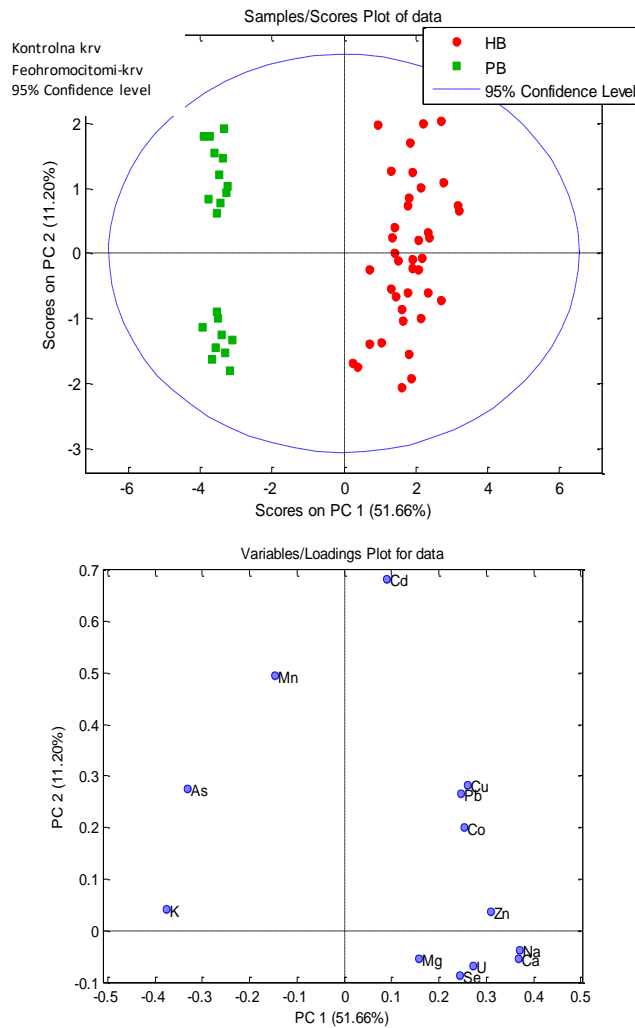
Premda je izazovno dati zaključke na osnovu trenutnog uvida u elementalni status krvi pacijenata obolelih od PCC, Mn bi se mogao razmatrati u suplementacionoj strategiji kod pacijenata sa PCC, pošto su zabeležene njegove snižene koncentracije u tkivima i punoj krvi. Povišene koncentracije Se u PCC uzorcima i njegove snižene vrednosti u krvi pacijenata obolelih od PCC mogle bi da ukažu da PCC koristi Se iz krvotoka u procesu maligne promene.

Multivarijantna analiza je takođe primenjena na rezultate dobijene analizom adrenalnog tkiva i pune krvi pacijenata obolelih od feohromocitoma, kako bi se omogućila dodatna interpretacija podataka. PCA koja prikazuje klasifikaciju ZAT i PCC uzoraka na osnovu koncentracija elemenata nalazi se na slici 51, dok je PCA za uzorke pune krvi prikazana na slici 52.



**Slika 51. PCA za uzorke PCC i ZAT**

Dobijeni PCA model za uzorke adrenalnog tkivnog materijala (slika 51) sastoji se od četiri glavne komponente koje sadrže 59,32% informacija o varijabilitetu koncentracija elemenata. Komponenta PC1 čini 39,66% ukupnog varijabiliteta podataka, dok komponenta PC2 obuhvata 19,66%. Grafik 51a ukazuje na to da se dve grupe razdvajaju po komponenti PC1 (ZAT i PCC uzorci). Može se uočiti da su PCC uzorci grupisani sa desne strane, dok se ZAT nalaze na levoj strani. Grafik prikazan na slici 51b ukazuje na to da su se elementi Co, Cd, As, Zn, Se, Cu, Mg, Ca i Na istakli u razdvajanju PCC uzoraka od ZAT. Uočava se da su koncentracije U i Pb bile slične u ZAT i PCC uzorcima, što implicira da pomenuti elementi nisu značajni u razdvajanju ovih uzoraka adrenalnog tkivnog materijala.



.....a).....b)...

**Slika 52.** PCA za uzorke kontrolne krvi i krvi pacijenata obolelih od feohromocitoma

PCA prikazan na slici 52 za uzorke krvi pacijenata sa feohromocitomima i kontrolne krvi obuhvata model koji pokriva 62,86% ukupnog varijabiliteta podataka. PC1 komponenta obuhvata 51,66% ukupnog varijabiliteta podataka, dok PC2 čini 11,20%. Na grafiku 52a jasno se razdvajaju dve grupe duž PC1, gde su kontrolni uzorci grupisani sa desne strane grafika, dok su uzorci pacijenata obolelih od feohromocitoma grupisani sa leve strane. Takođe, zanimljivo je istaći razdvajanje uzoraka krvi osoba obolelih od feohromocitoma duž PC2 ose. Na grupisanje kontrolnih uzoraka krvi uticali su Cu, Pb, Co, Zn, Na, Ca, U i Se (52b), dok su na grupisanje uzoraka krvi osoba sa feohromocitomima uticali As i K.

### 4.3. Kušingov sindrom

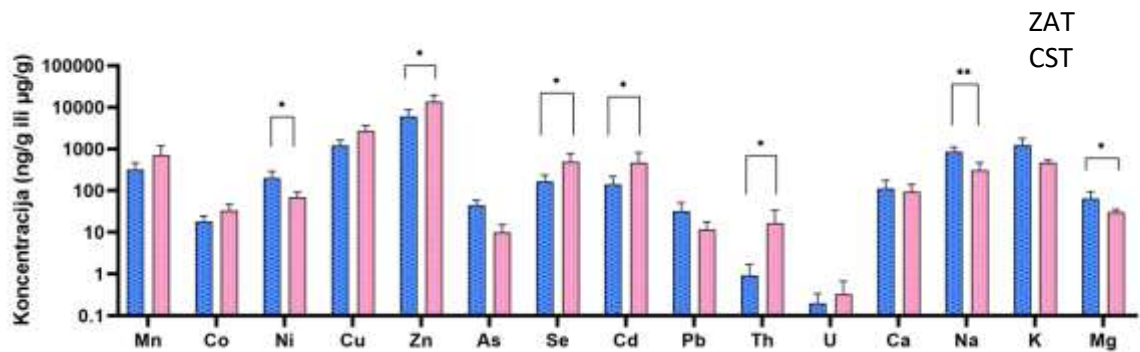
#### 4.3.1. Adrenalni tkivni materijal

Analizirano je 13 uzoraka adrenalnih tkiva pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma (CST) i njihov elementalni status je upoređen sa zdravim (kontrolnim adrenalnim tkivima). U tabeli 28 prikazani su parametri deskriptivne statistike i odabranih percentila određivanih elemenata, a na slici 53 su prikazana poređenja koncentracija elemenata adrenalnih materijala sakupljenih od kontrolnih ispitanika i pacijenata.



**Tabela 28.** Parametri deskriptivne statistike i percentila za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) i u uzorcima CST. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Na	Mg	K	Ca
Sr vrednost	721	33,23	69,2	2754	13669	10,10	497	470	11,77	16,54	0,33	316	30,2	478	92,8
st.dev.	477	14,06	22,2	907	5845	5,11	281	345	6,02	17,33	0,34	155	5,36	61,4	48,3
min	296	10,2	41,7	1624	6298	5,19	195	80,8	6,54	2,92	0,01	179	26,9	410	37,1
max	1319	44,4	92,6	3667	22121	18,3	819	939	21,6	46,4	0,79	484	36,4	529	121,5
medijana	541	40,95	76,8	2780	12343	9,64	601	330	9,05	9,62	0,18	284	27,3	494	119,9
GM	596	29,54	66,1	2625	12613	9,18	421	350	10,73	11,00	0,15	291	29,9	475	81,4
P5	299	14,07	43,4	1717	7370	5,48	197	124	6,92	3,87	0,03	189	27,0	418	45,4
P25	312	29,45	50,1	2086	11658	6,65	209	297	8,41	7,71	0,10	232	27,1	452	78,5
P75	1138	41,13	84,8	3610	15926	10,68	664	702	13,22	16,11	0,60	384	31,8	511	120,7
P95	1283	43,75	91,1	3656	20882	16,81	788	892	19,93	40,31	0,75	464	35,5	526	121,3
U-test P-vrednost	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	>0,05



Slika 53. Koncentracije mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima ZAT i CST. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0,05$ ) i \*\* ( $P < 0,01$ ).

Rezultati analize ukazali su da su CST imala značajno više koncentracije Zn, Se, Cd, Th i Mg, dok su ZAT uzorci imali viši sadržaj Ni, Na i K. Najzastupljeniji mikroelement u CST uzorcima bio je Zn, zatim Cu, Mn, Se, Cd, Ni, Co, Th, Pb, As i U. Najzastupljeniji makroelement u CST uzorcima bio je K, zatim Na, Ca i Mg.

Usled malog broja uzoraka adrenalnog tkivnog materijala nije bilo moguće podeliti uzorke na osnovu pola, godina života i konzumiranja cigareta.

Status elemenata u adrenalnom tkivnom materijalu kao i punoj krvi osoba obolelih od Kušingovog sindroma do sada nije dovoljno istražen u literaturi. Fokus prethodnih studija bio je pretežno na utvrđivanju statusa hormona ili praćenja terapijskog učinka lekova (Raff i sar. 2015; Pivonello i sar. 2015).

Rezultati ove disertacije pružili su prvi uvid u koncentracije odabranih esencijalnih i toksičnih mikroelemenata kako u adrenalnim tkivima, tako i u punoj krvi osoba obolelih od Kušingovog sindroma.

Sinteza, lučenje i metabolizam brojnih hormona, posebno hormona nadbubrežne žlezde, u velikoj meri zavise od Zn. Rezultati ove disertacije su ukazali da je koncentracija Zn u tkivima osoba obolelih od Kušingovog sindroma dvostruko viša u odnosu na ZAT. To bi se moglo objasniti uticajem kortizola na sadržaj Zn, koji povećava ekspresiju gena za metalotioneine i ZIP-14. Povišeni kortizol, osim koncentracije Zn, utiče i na koncentracije drugih esencijalnih elemenata, poput Se i Mg (Patani i sar. 2023). Interesantno je pomenuti da su rezultati ove disertacije ukazali da je Mn bio povišen u obolelim tkivima, iako nije uočena statistička značajnost. Hughes i saradnici primetili su da održavanje optimalnih nivoa Mn u organizmu zavisi od kortizola i da oštećenje nadbubrežne žlezde izazvano oboljenjima poput Kušingovog sindroma može rezultirati akumuliranjem ovog elementa (Hughes i sar. 1966).

Esencijalni elementi, osim poznatih benefita, mogu izazvati i toksične efekte u organizmu u zavisnosti od unetih koncentracija. Prekomerne koncentracije Mn mogu izazvati neurotoksičnost, uz simptome tremora, ukočenosti i poteškoća sa kretanjem. Cink u toksičnim koncentracijama može izazvati anemiju i poremećaj u funkciji imunskog sistema. Selen u prekomernim dozama dovodi do gastrointestinalnih problema i oštećenje nervnog sistema i jetre. Maksimalne dnevne unete koncentracije za koje se procenjuje da ne mogu izazvati toksični efekat se u literaturi nazivaju gornji nivo unosa (engl upper level limit - UL). Gornji nivo unosa za Zn za odraslu populaciju iznosi 40mg/danu, za Se iznosi 0.4mg/danu, dok je za Mn 8mg/danu (Institute of medicine, 2001).

Selen se, pored cinka, prema rezultatima ove disertacije, istakao kao značajan mikroelement u razdvajanju CST uzoraka od kontrola. Usled oboljenja nadbubrežne žlezde,

poput Kušingovog sindroma, dolazi do poremećaja u lučenju hormona, pojačane aktivacije HPA osovine i samim tim do pojačanog oksidativnog stresa (Kairys i sar. 2023; Patani i sar. 2023). Pojačan oksidativni stres dovodi do pada enzimske aktivnosti, što bi moglo da objasni povišene koncentracije Se u CST uzorcima prikazanim u ovoj disertaciji.

Kao što je već navedeno, Cd je jak endokrini disruptor, koji ispoljava negativne efekte na adrenalnu homeostazu. Takođe, uočeno je da Cd može da aktivira specifične signalne puteve ili da blokira interakcije hormona i receptora (Bimonte i sar. 2021). Yang i saradnici primetili su da izloženost Cd putem ishrane izaziva disrupciju adrenokortikalnih hormona (Yang i sar. 2024). Uprava za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration-FDA) predložila je opseg toksikološke referentne vrednosti za Cd od 0,21-0,36 µg/kg telesne težine po danu (Pokharel and Wu 2023).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazali su da je sadržaj Cd čak četiri puta veći u obolelom tkivu u odnosu na kontrolno, što ističe njegov značaj u Kušingovom sindromu i potencijalno ga izdvaja kao ključni mikroelement za ispitivano oboljenje. Međutim, studije na većem broju uzoraka su potrebne kako bi se potvrdio ili odbacio uticaj Cd na etiologiju Kušingovog sindroma, odnosno na steroidogenezu ovog oboljenja.

Nikl je dobro poznat endokrini disruptor. Uočen je njegov negativan uticaj na steroidogenezu (Beshir i sar. 2016). Rezultati ove disertacije ukazuju na povišene koncentracije Ni u zdravim adrenalnim tkivima. Nikl takođe može uticati na aktivnost određenih metaloenzima/metaloproteina, menjajući koncentraciju esencijalnih elemenata koji su njihov sastavni deo. Izmena u aktivnosti metaloenzima za posledicu može imati promene u lučenju angiotenzina II i ACTH, što sa sobom povlači negativan efekat na lučenje kortikosterona i potencijalno utiče na uvećanje nadbubrežne žlezde (Yang i Ma, 2021). Prema ATDSR-u, gornji nivo unosa za Ni iznosi 1mg/danu za odraslu populaciju (ATSDR 2023).

Sadržaj Th je u tkivima pacijenata sa Kušingovim sindromom bio i do 18 puta veći u odnosu na ZAT. Podaci iz literature nagoveštavaju uticaj Th na nadbubrežne žlezde nakon primene torotrasta, kontrastnog agensa (van Kaick i sar. 1999). Takođe, bitno je istaći da je Th produkt raspada U, što može objasniti njegove povišene koncentracije u CST uzorcima.

Povišena koncentracija Na u tkivima i snižena koncentracija Na u uzorcima krvi osoba obolelih od Kušingovog sindroma može se objasniti sprečavanjem kliničke manifestacije samog oboljenja primenom adekvatne terapije. Naime, povišeni sadržaj kortizola ima direktan uticaj na retenciju Na i vode (Whithworth i sar. 2000), što za rezultat može imati povišen krvni pritisak kod pacijenata. S obzirom na to da su pacijenti hirurški lečeni, nije isključena mogućnost da su im simptomi povišenog krvnog pritiska kontrolisani pre operacije. Gornji nivo unosa za Na iznosi 2.3 g/danu, za Mg 350 mg/danu, a za K nije ustanovljen, zbog izuzetno retkih negativnih efekata po zdravlje (Costello i sar. 2023; Oria et al. 2019; Kurajoh i sar. 2018).

Kod pacijenata sa Kušingovim sindromom može da se javi hipokalemična alkalozna (Nemergut 2010), usled poremećenog metabolizma K. Kod osoba obolelih od ovog sindroma preporučuje se ishrana bogata K, kao i adekvatna suplementacija, kako bi se regulisao izmenjen metabolizam K. Rezultati ove disertacije su ukazali da tkiva obolelih od Kušingovog sindroma imaju značajno niže koncentracije K od kontrolnih uzoraka. Razmatra se upotreba Mg u lečenju posledica Kušingovog sindroma (Kurajoh i sar. 2018). Rezultati prikazani u disertaciji ukazali su da je Mg bio snižen u uzorcima obolelog tkiva.

### 4.3.2. Puna krv

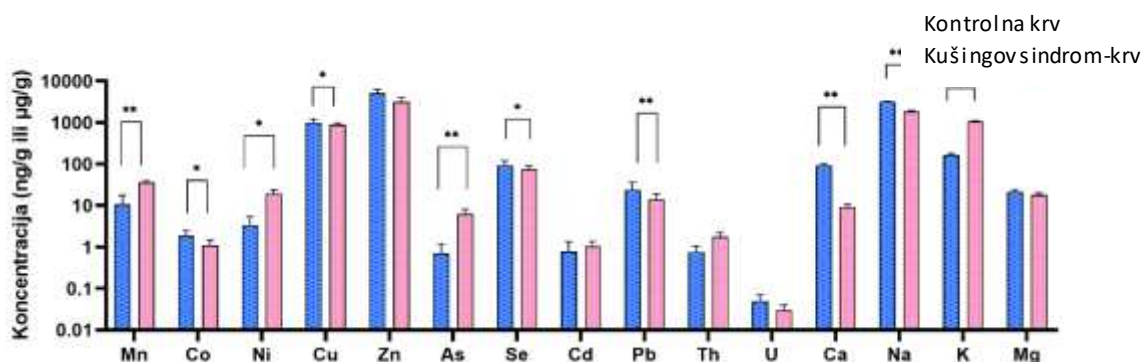
**Tabela 29.** Parametri deskriptivne statistike i percentila za koncentracije mikroelemenata (ng/g) i makroelemenata ( $\mu\text{g/g}$ ) u uzorcima pune krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Razlike između grupa ispitane su Man-Vitni U testom ( $P < 0,05$ ). Statistički značajne vrednosti su **boldovane**.

		Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Na	Mg	K	Ca
Kušingov sindrom krv	Sr.vrednost	26,3	1,09	19,5	892	3174	6,36	74,73	1,05	14,2	1,76	0,02	1862	18,1	1078	9,13
	st.dev.	3,16	0,41	4,33	94,2	849	1,79	17,47	0,32	4,95	0,46	0,01	108	2,22	40,4	1,91
	min	23,0	0,48	16,5	824	1989	3,94	59,85	0,70	8,51	1,31	0,01	1752	15,0	1035	7,13
	max	30,4	1,33	26,0	1031	4009	8,07	97,57	1,45	19,7	2,16	0,02	1993	21,0	1126	10,4
	medijana	25,9	1,28	17,9	857	3348	6,71	70,76	1,02	14,3	1,79	0,02	1842	18,4	1072	9,61
	GM	26,2	1,01	19,2	888	3075	6,14	73,27	1,01	13,5	1,72	0,02	1860	18,0	1077	9,52
	P5	23,3	0,60	16,7	827	2188	4,28	60,23	0,73	9,03	1,33	0,01	1752	15,3	1035	6,54
	P25	24,4	1,06	17,3	839	2984	5,62	61,72	0,84	11,1	1,39	0,01	1775	16,6	1045	7,98
	P75	27,8	1,31	20,1	909	3538	7,45	83,77	1,23	17,5	2,16	0,02	1955	19,4	1112	9,86
	P95	29,9	1,33	24,8	1006	3915	7,94	94,81	1,40	19,2	2,16	0,02	1991	20,6	1125	9,91
U-test	P-vrednost	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>

Parametri deskriptivne statistike i odabranih percentila za koncentracije analiziranih elemenata u punoj krvi pacijenata sa Kušingovim sindromom prikazani su u tabeli 29. U poređenju sa uzorcima grupe pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma, može se uočiti da su kontrolni uzorci krvi imali značajno manje koncentracije Mn, Ni, As i K, dok su im koncentracije Co, Cu, Se, Pb, Na i Ca bile značajno povišene.

Iz dobijenih rezultata može se uočiti da je najzastupljeniji mikroelement u uzorcima pune krvi pacijenata sa Kušingovim sindromom bio Zn, zatim Cu, Se, Mn, Ni, Pb, As, Th, Co i U, dok su makroelementi pokazali sledeću distribuciju: Na > K > Mg > Ca.

Zbog malog broja uzoraka krvi pacijenata sa Kušingovim sindromom nije bilo moguće izvršiti adekvatnu podelu na osnovu pola, godina života i konzumiranja duvana.



**Slika 54.** Koncentracije mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima kontrolne krvi i krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Kao što je bio slučaj i sa prethodno prikazanim uzorcima, rezultati elementarne analize pune krvi i adrenalnih tkiva obolelih od Kušingovog sindroma podvrgnuti su Spearman-ovoj korelaciji.

**Tabela 30.** Rezultati Spirmanove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u uzorcima CST. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	0,359	0,461	<b>0,926</b>	<b>0,753</b>	<b>0,867</b>	<b>0,552</b>	<b>0,705</b>	-0,325	<b>0,673</b>	0,329	0,279	0,343	-0,278	<b>0,635</b>
Co		1	0,052	0,359	0,051	0,205	<b>0,821</b>	0,329	0,102	0,359	-0,357	-0,215	0,117	-0,115	-0,065
Ni			1	0,472	<b>0,841</b>	<b>0,659</b>	0,137	0,458	0,429	0,452	<b>0,784</b>	0,140	0,454	-0,457	0,508
Cu				1	<b>0,865</b>	<b>0,878</b>	<b>0,632</b>	<b>0,678</b>	-0,313	<b>0,701</b>	0,405	0,279	0,342	-0,343	0,317
Zn					1	<b>0,897</b>	0,285	<b>0,682</b>	0,231	<b>0,653</b>	<b>0,857</b>	0,280	0,457	-0,458	0,508
As						1	0,438	<b>0,864</b>	0,004	0,469	<b>0,652</b>	0,419	0,456	-0,459	-0,190
Se							1	<b>0,653</b>	-0,237	0,294	-0,101	0,140	0,228	-0,229	-0,127
Cd								1	0,195	0,213	0,420	-0,114	0,454	-0,457	0,004
Pb									1	0,002	0,106	-0,139	-0,140	-0,228	0,127
Th										1	0,498	-0,137	-0,139	0,138	<b>0,644</b>
U											1	0,276	0,279	-0,344	0,517
Ca												1	<b>0,953</b>	<b>-0,986</b>	0,429
Na													1	<b>-0,967</b>	0,386
K														1	-0,427
Mg															1

Rezultati Spirmanove korelacije u uzorcima CST (tabela 30) ukazuju na pozitivne korelacije među esencijalnim i toksičnim mikroelementima i makroelementima. Uočene su svega dve jake negativne korelacije između makroelemenata, između Ca i K, kao i između Na i K. Najjača pozitivna korelacija zabeležena je između Na i Ca, koju sledi korelacija Mn sa Cu, dok je najslabija korelacija dobijena između Cu i Se.

Rezultati analize u uzorcima krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma (tabela 30) su ukazale na pozitivne i značajne korelacije između ispitivanih elemenata. Između K i Mg je zabeležena najjača pozitivna korelacija, dok su Zn i As imali najslabiju pozitivnu korelaciju. Mangan i Th su se istakli kao elementi sa najviše korelacija u uzorcima krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Interesantno je istaći da nije bilo značajnih negativnih korelacija.

**Tabela 31.** Rezultati Spearman-ove korelacije za određivane mikroelemente i makroelemente u uzorcima krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Statistički značajne  $\rho$  vrednosti su **boldovane**.

	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Th	U	Ca	Na	K	Mg
Mn	1	<b>0,816</b>	<b>0,668</b>	<b>0,756</b>	0,421	0,433	-0,051	-0,200	0,212	<b>0,789</b>	0,113	-0,148	-0,159	-0,039	0,018
Co		1	<b>0,622</b>	0,479	<b>0,811</b>	<b>0,734</b>	0,412	-0,101	0,230	<b>0,823</b>	0,083	-0,349	-0,322	-0,258	-0,188
Ni			1	<b>0,739</b>	0,434	0,483	-0,095	-0,512	0,238	<b>0,739</b>	-0,027	-0,308	-0,462	-0,300	-0,258
Cu				1	0,503	0,236	-0,201	-0,455	0,024	0,532	0,002	-0,189	-0,374	-0,045	-0,063
Zn					1	<b>0,598</b>	0,264	-0,056	0,140	<b>0,770</b>	-0,139	-0,203	-0,195	-0,238	-0,230
As						1	0,609	-0,177	-0,052	<b>0,758</b>	-0,278	-0,209	-0,228	-0,280	-0,336
Se							1	0,065	-0,349	0,176	-0,140	-0,338	-0,423	-0,234	-0,307
Cd								1	0,350	-0,111	-0,028	-0,296	0,101	-0,217	-0,168
Pb									1	0,231	0,195	-0,034	-0,006	-0,161	-0,021
Th										1	-0,066	-0,276	-0,234	-0,255	-0,223
U											1	0,083	0,027	<b>0,641</b>	<b>0,752</b>
Ca												1	<b>0,790</b>	<b>0,727</b>	<b>0,678</b>
Na													1	0,512	0,505
K														1	<b>0,972</b>
Mg															1



**Tabela 32.** Hormonski status pacijenata sa Kušingovim sindromom

	Noradrenalin ng/L	Adrenalin ng/L	Dopamin ng/L	ACTH pmol/L	Kortizol nmol/L	Aldosteron pmol/L
<b>Sr.vrednost</b>	128,40	15,23	503,72	13,15	665	245,10
<b>st dev</b>	129,95	20,67	473,57	3,87	206	285,62
<b>min</b>	15,37	1,72	163,28	9,26	396	37,80
<b>max</b>	276,80	45,90	1195,20	17,00	900	570,90
<b>medijana</b>	110,71	6,64	328,20	13,20	673	126,60
<b>GM</b>	66,65	7,43	372,95	12,76	634	139,80
<b>P5</b>	16,58	2,10	174,13	9,65	435	46,68
<b>P25</b>	21,41	3,64	217,51	11,23	592	82,20
<b>P75</b>	217,70	18,23	614,40	15,10	741	348,75
<b>P95</b>	264,98	40,37	1079,04	16,62	868	526,47
<b>QR 1</b>	21,41	3,64	217,51	11,23	592	82,20
<b>QR 3</b>	217,70	18,23	614,40	15,10	741	348,75
<b>IQR</b>	196,29	14,59	396,89	3,87	149	266,55
<b>REFERENTNE VREDNOSTI HORMONA</b>						
	Noradrenalin ng/L	Adrenalin ng/L	Dopamin ng/L	ACTH pmol/L	Kortizol nmol/L	Aldosteron pmol/L
<b>Referentni opseg</b>	70—1700	0—140	0—30	1,6 – 13,9	140 – 690	190—830

Tabela 32 sadrži prikaz hormonskog statusa pacijenata sa Kušingovim sindromom. Može se uočiti da je kortizol povišen, što je i karakteristika ovog oboljenja, dok su ostali hormoni u granicama referentnih opsega.

Rezultati ove disertacije istakli su Mn kao element čiji je sadržaj u uzorcima krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma bio oko dva puta viši u odnosu na kontrolne uzorke. Povišene koncentracije Mn u uzorcima pune krvi osoba obolelih od Kušingovog sindroma može biti posledica pojačanog oksidativnog stresa izazvanog oboljenjem i pojačane enzimске aktivnosti (Hughes i sar. 1966).

Selen, kao mikroelement koji igra značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti organizma, utiče na funkcionisanje enzima poput tioredoksin-reduktaze (Patani i sar. 2023). Rezultati su istakli da su koncentracije Se bile snižene u uzorcima pune krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma, što bi moglo da ukazuje da se ovaj mikroelement odvodi direktno u obolelo tkivo iz cirkulacije. Interesantno je istaći da su rezultati ukazali na niže koncentracije Ni u kontrolnim uzorcima krvi u odnosu na uzorke krvi pacijenata sa Kušingovim sindromom. Više koncentracije Ni kod obolelih mogle bi da ukazu na značaj nikla u nastanku oboljenja, ali dodatna istraživanja su neophodna kako bi se data hipoteza potvrdila. Niže koncentracije Ca i Na u uzorcima krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma u odnosu na kontrolne uzorke su u skladu sa kliničkom manifestacijom ovog oboljenja. Rezultati su takođe ukazali da su koncentracije K bile više u uzorcima krvi osoba obolelih od Kušingovog sindroma. Zanimljivo je istaći da su koncentracije Mg bile snižene u uzorcima krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma, iako nije zabeležena statistička značajnost. Moguće je da usled Kušingovog sindroma dolazi do previsokog izlučivanja ovog elementa iz organizma, ali dalje studije su neophodne na većem broju analiziranih uzoraka kako bi se prikazani nalazi potvrdili.

Arsen je poznati endokrini disruptor. Utvrđeno je da izaziva abnormalnu ekspresiju kortikosteroidnih receptora. Prema rezultatima ove disertacije, As je bio povišen u krvi osoba sa Kušingovim sindromom, što može ukazati na njegov uticaj na nastanak oboljenja. Arsen može imati uticaj na aktivnost receptora za glukokortikoide blokirajući vezivanje

steroida. Pretpostavlja se da isti efekat ispoljava i na receptorima za mineralokortikoide (Sun i sar. 2016).

Niske koncentracije Co su retke kod ljudi, ali mogu da se jave usled određenih oboljenja, poput anemije (Yamada 2013). Kontrolni uzorci imali su više koncentracije Co od uzoraka krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma.

Bakar je bio snižen u punoj krvi osoba sa Kušingovim sindromom. Pored značajnih uloga koje Cu ima u organizmu, ključno je održavati njegove optimalne koncentracije. ATSDR (engl. Agency for Toxic Substances and Disease Registry) je istakao da na pojavu Kušingovog sindroma može uticati i izmenjena toksikokinetika bakra (ATSDR 2022).

Vredno pomena je da je Pb bilo sniženo kako u krvi pacijenata, tako i u adrenalnim tkivima. Poznato je da Pb može izazvati hiper- i hiporeaktivnost HPA osovine (Souza-Talarico i sar. 2017).

Kod osoba koje boluju od Kušingovog sindroma prekomerna proizvodnja glukokortikoida narušava proces koštanog remodelovanja. Osim toga, utiče na smanjenje apsorpcije Ca u crevima, dok istovremeno povećava izlučivanje Ca putem urina. Ovaj kompleksan proces rezultira kompenzatornom stimulacijom lučenja PTH. Snižen Ca u uzorcima krvi osoba sa Kušingovim sindromom prikazan u ovoj disertaciji uklapa se sa kliničkom manifestacijom ovog oboljenja (Tomita 1998).

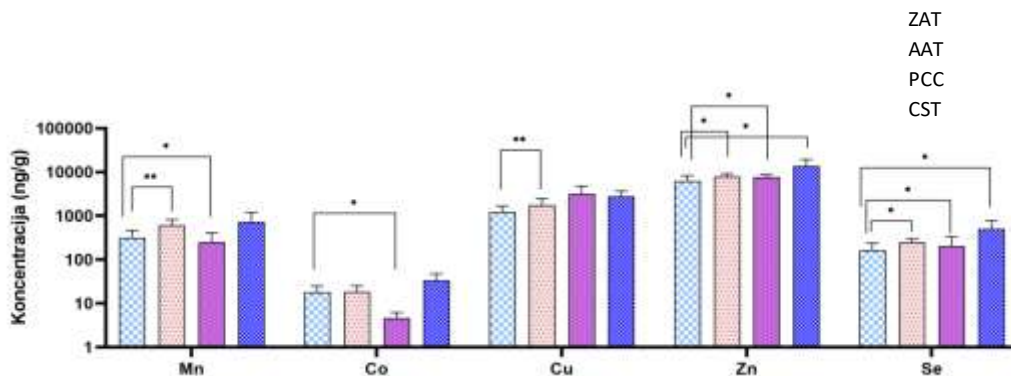
#### 4.4. Komparativna analiza ispitivanih patoloških stanja nadbubrežne žlezde

S'obzirom na slabo istražen osnovni elementalni status zdrave nadbubrežne žlezde, teško je porediti rezultate ove disertacije sa rezultatima drugih istraživanja. Takođe, bitno je istaći da je nepoznat i elementalni status patoloških stanja nadbubrega. Predmet komparativne analize je poređenje koncentracija određivanih esencijalnih i toksičnim mikroelemenata i makroelemenata u ispitivanim kontrolnim uzorcima sa uzorcima pacijenata obolelih od adrenalnih adenoma, feohromocitoma i Kušingovog sindroma.

##### 4.4.1. Esencijalni mikroelementi

Analiza esencijalnih mikroelemenata u uzorcima kontrolnog adrenalnog tkivnog materijala, kao i nadbubrežne žlezde obolele od adenoma, PCC i Kušingovog sindroma pokazala je interesantne rezultate. Naime, primenom Mann-Whitney U testa uočeno je da su se od esencijalnih mikroelemenata Se i Zn izdvojili kao značajni u razdvajanju zdravog tkiva od svih obolelih, gde su oba elementa bila značajno niža u zdravim tkivima (slika 53). Bakar je bio značajno niži u zdravom tkivu u odnosu na AAT, dok je Co bio značajno viši u odnosu na PCC. Mangan je bio viši u AAT, a niži u PCC u odnosu na ZAT.

Ove varijacije u koncentracijama elemenata među uzorcima (slika 55) ukazuju na mogućnost uspostavljanja jasnih razlika između različitih patologija nadbubrežne žlezde.

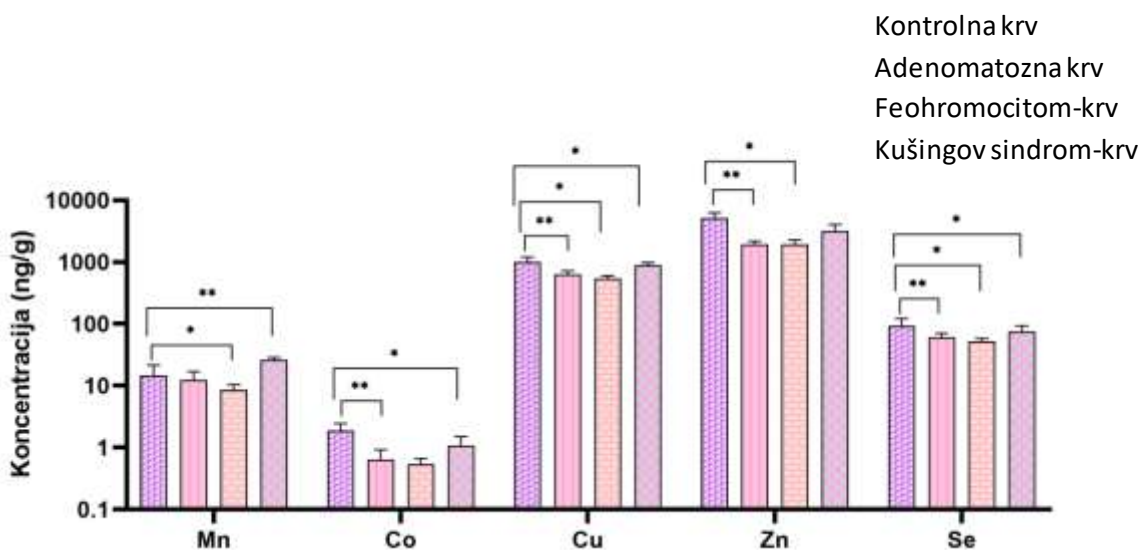


**Slika 55.** Razlike u koncentracijama esencijalnih elemenata između ZAT, AAT, PCC i CST uzoraka. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

U literaturi je zabeleženo da se Se prirodno distribuira u tkivu nadbubrega, tačnije, da se može naći u hromafinim ćelijama ove žlezde. Hromafine ćelije nadbubrega imaju ulogu u lučenju kateholamina, koji održavaju homeostazu organizma i pomažu u odbrani od spoljnih stresora (Uezono i sar. 2006).

Glutation-peroksidaza je u velikom procentu zastupljena u citosolu ćelija korteksa nadbubrežne žlezde. Nedostatak Se može uticati na smanjenu aktivnost ovog enzima, što su u svom istraživanju potvrdili Chanoine i saradici (Chanoine i sar. 2004). Uočeno je da je Se bio značajan u razdvajanju kontrola od krvi pacijenata ispitivanih nabubrežnih patologija. U slučaju pune krvi, za razliku od adrenalnih tkiva, kontrole su imale više nivoa Se. Ovakvi rezultati ukazuju na potencijalni značaj Se u patofiziologiji nadbubrega.

Cink je bio značajno povišen u svim obolelim adrenalnim tkivnim materijalima u poređenju sa kontrolnim. Cink je neophodan za glukokortikoidnu signalizaciju i oslobađa se iz glutamatergičnih neurona. Promene u glukokortikoidnoj signalizaciji usled stresa ili oboljenja može doprineti izmenjenoj koncentraciji ekstracelularnog Zn. Smanjenje koncentracije Zn nakon izlaganja stresu može biti delimično posledica značajno povećanje sinteze metalotioneina (Takeda i Tamano 2010). Iako nije bio statistički značajan samo između kontrolne krvi i uzoraka pune krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma, rezultati ukazuju na njegovu smanjenu koncentraciju u uzorcima krvi obolelih od Kušingovog sindroma. ACTH, koji utiče na sintezu kortikosteroida, funkcionalno zavisi od Zn. Međutim, uočeno je da povišeni nivoi ACTH i glukokortikoida izazivaju smanjenje koncentracije Zn (Neve 1992).



**Slika 56.** Razlike u koncentracijama esencijalnih mikroelemenata između kontrolne krvi, adenomatozne krvi, krvi pacijenata obolelih od PCC i uzoraka krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

U uzorcima pune krvi se, osim Zn, istakao i Cu u razdvajanju grupa, gde je uočeno da je bio povišen kod kontrola u odnosu na pacijente. Bakar je u krvotoku pretežno vezan za ceruloplazmin i  $\alpha$ 2-makroglobulin, glikoprotein kojeg osim jetre sintetišu i nadbubrezi (El-Mofty 1977).

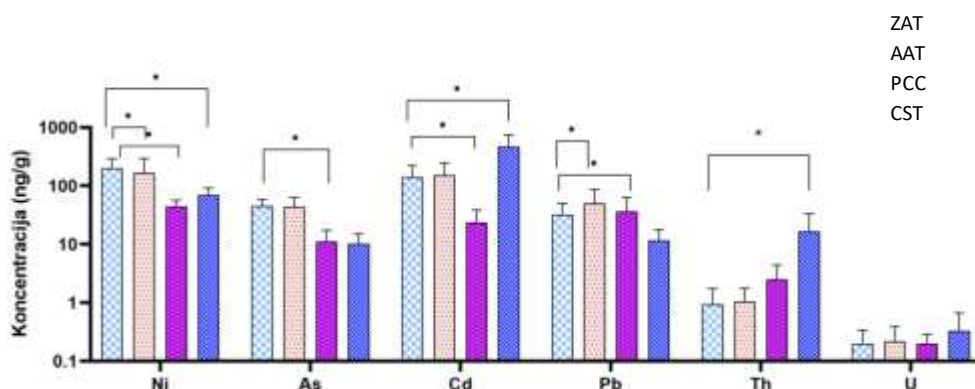
Uočeno je da nadbubrežni hormoni, primarno kortikosteron, mogu imati uticaj na mobilizaciju Cu iz jetre (El-Mofty 1977). Takođe, Cu utiče na sintezu noradrenalina u nadbubrezima (Lutsenko 2016). ACTH i glukokortikoidi mogu da izazovu povećanje nivoa ceruloplazmina u serumu, koji sadrži Cu (Neve 1992). Iako nije bilo statističke značajnosti, uočeno je da tkiva pacijenata imaju više koncentracije Cu od kontrola.

#### 4.4.2. Toksični mikroelementi

U literaturi je poznato da određeni mikroelementi imaju toksičan efekat na organizam i da mogu uticati na pojavu različitih oboljenja. Neke studije su ukazale da izlaganje toksičnim elementima može negativno uticati na HPA osovinu i izazvati zdravstvene posledice (Bjørklund i sar. 2020).

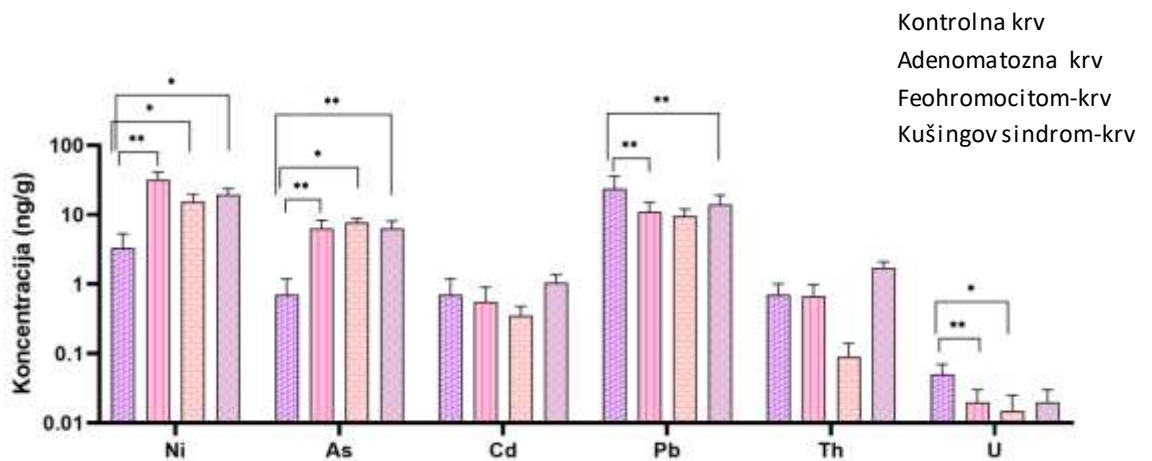
Rezultati uporedne analize sadržaja elemenata u uzorcima solidnih tkiva ukazali su da se Ni izdvojio u razdvajanju kontrolnih tkiva od svih obolelih. Zanimljivo je istaći da je Ni bio značajno povišen u zdravim tkivima.

Koncentracija As bila je značajno povišena u zdravom tkivu u odnosu na PCC, dok je koncentracija Th bila značajno povišena kod CST uzoraka. Interesantno je uočiti da je Cd bio značajno viši u CST uzorcima, a značajno niži kod PCC uzoraka u odnosu na kontrole, dok su vrednosti između ZAT i AAT bile veoma slične. ZAT uzorci su imali značajno niže koncentracije Pb u odnosu na AAT i PCC tkiva (slika 57).



**Slika 57.** Razlike u koncentracijama toksičnih mikroelemenata između ZAT, AAT, PCC i CST uzoraka. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Prema ATSDR-u, procenjuje se da dnevni unos nikla kroz hranu i vodu iznosi u proseku 0,001-0,0024 mg/kg/dan (ATSDR 2023). Osim ishrane, ako se izuzme profesionalna izloženost, izvor Ni je duvanski dim. Procenjuje se da svaka cigareta sadrži u proseku oko 1,1-3,1 mg Ni (Lukac i sar. 2020). Uočeno je da su ljudi izloženi e-otpadu, koji sadrži visok procenat Ni, imali povišen kortizol i ACTH, što ukazuje na poremećaj u radu HPA osovine (Li i sar. 2020). Bitno je napomenuti da je Ni jedini toksični element koji se izdvojio kao značajan u razdvajanju svih uzoraka solidnih tkiva, kao i uzoraka krvi (slika 56). Prema dobijenim rezultatima, Ni je bio snižen u tkivima obolelih, a povišen u punoj krvi.



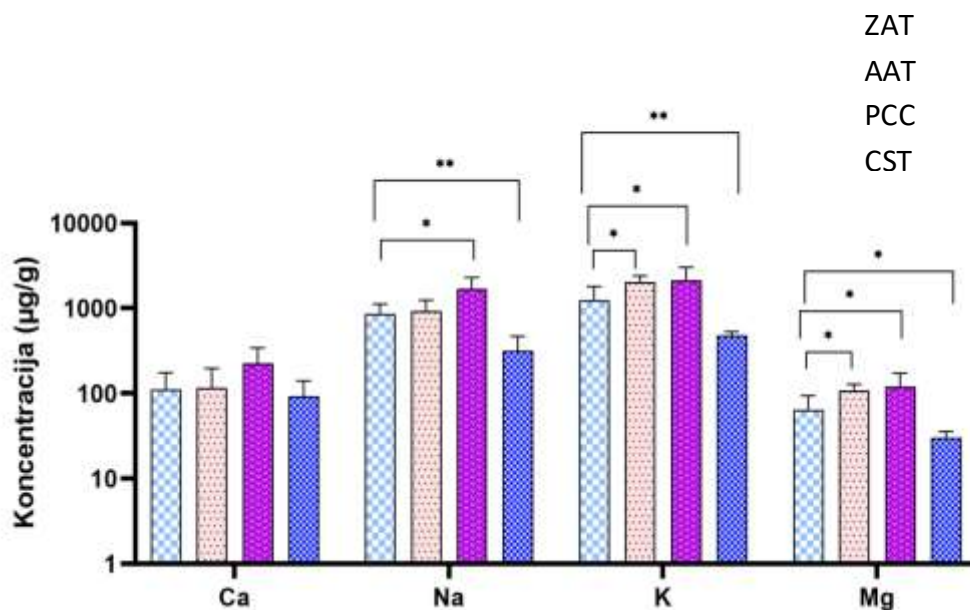
**Slika 58.** Razlike u koncentracijama toksičnih mikroelemenata između kontrolne krvi, adenomatozne krvi, krvi pacijenata obolelih od PCC i uzoraka krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Pored Ni, As je razdvojio sve grupe u uzorcima pune krvi (slika 58), gde je uočeno da je ovaj toksični mikroelement bio viših koncentracija kod obolelih u odnosu na kontrole. Kortikosteroidi izazivaju povećanje nivoa triglicerida u plazmi i slobodnih masnih kiselina. Kortikosteroidi takođe pokreću katabolizam u mišićima i adipoznom tkivu, tako da postoji prekomerna dostupnost supstrata za stvaranje glukoze. Rezultati drugih studija ukazali su da As može da modifikuje aktivnost glukokortikoida i efikasno blokira vezu steroida sa glukokortikoidnim receptorima (Yoshinaga-Sakurai i sar. 2022; Sabir i sar. 2019).

Rezultati disertacije su ukazali da je Pb bilo povišeno kod kontrolnih uzoraka u odnosu na uzorke adenomatozne krvi i uzorke krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma. Takođe, kontrolni uzorci su imali više koncentracije U u odnosu na uzorke adenomatozne krvi i krvi pacijenata obolelih od PCC.

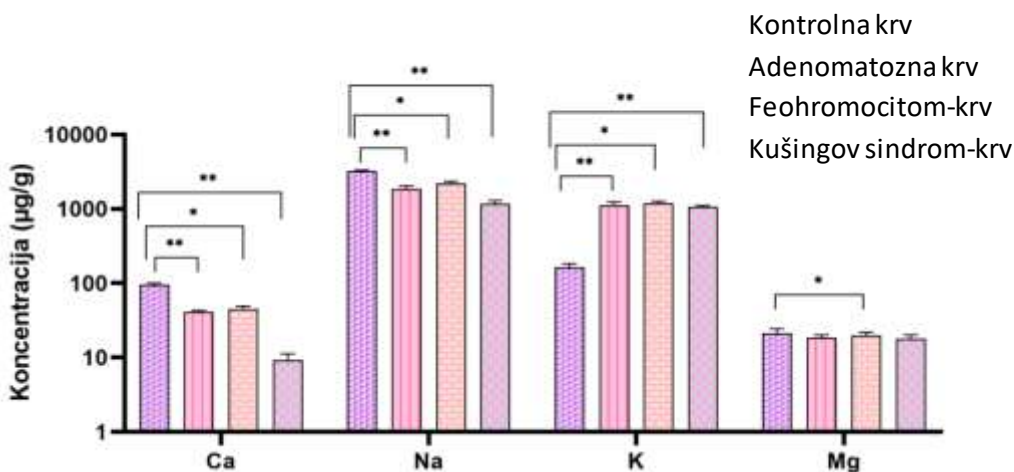
#### 4.4.3. Makroelementi

Uparednom analizom sadržaja makroelemenata u uzorcima tkiva uočeno je da su se K i Mg istakli u razdvajanju zdravih tkiva od svih obolelih (slika 59). Natrijum je bio niži u ZAT u odnosu na PCC, a viši u odnosu na CST. Kalcijum se nije pokazao značajnim u razdvajanju ispitivanih uzoraka.



**Slika 59.** Razlike u koncentracijama makroelemenata između ZAT, AAT, PCC i CST uzoraka. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Analiza uzoraka krvi ukazala je na K, Ca i Na kao makroelemente koji su se izdvojili u razdvajajnu kontrola od uzoraka krvi pacijenata (slika 60). Takođe, Mg je bio viših koncentracija u kontrolnim uzorcima u odnosu na uzorke krvi pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma.



**Slika 60.** Razlike u koncentracijama makroelemenata između kontrolne krvi, adenomatозна krvi, krvi pacijenata obolelih od PCC i uzoraka krvi pacijenata obolelih od Kušingovg sindroma. Statistički značajne razlike u koncentracijama obeležene su sa \* ( $P < 0.05$ ) i \*\* ( $P < 0.01$ ).

Kalijum je bio makroelement koji se istakao u uzorcima solidnih tkiva i pune krvi, gde je razdvojio kontrole od pacijenata. Blanchard i saradnici uočili su da snižen K utiče na nadbubrege inhibirajući sintezu aldosterona (Blanchard i sar. 2020). Povećani unos K snižava krvni pritisak kod pacijenata sa hipertenzijom, ali njegov prekomeran unos može imati suprotan efekat. Previsoke koncentracije K utiču na pojačano lučenje aldosterona koji podiže krvni pritisak u plazmi (Dreier i sar. 2021). Suštinska uloga aktivnosti K<sup>+</sup> kanala leži u podešavanju membranskog napona i samim tim utiče na lučenje aldosterona (Bandulik i sar. 2015).

## 5. ZAKLJUČAK

Ova disertacija je pružila prvi uvid u sadržaj esencijalnih i toksičnih mikroelemenata i makroelemenata u zdravom tkivu nadbubrežne žlezde. Takođe, pružen je inicijalni uvid u koncentracije mikro- i makroelemenata u uzorcima adrenalnog tkivnog materijala i pune krvi osoba obolelih od adrenalnih adenoma, feohromocitoma i Kušingovog sindroma, što ovu disertaciju ističe kao pionirsku u metalomskom istraživanju. U cilju dobijanja tačnih i preciznih rezultata analize za potrebe doktorske disertacije, sprovedena je optimizacija analitičkih tehnika korišćenih za ispitivanje uzoraka tkivnog materijala nadbubrega i uzoraka pune krvi.

Povišene koncentracije esencijalnih elemenata (Cu, Mn, Se, Zn, K, Mg) u uzorcima AAT ukazuju na povišen oksidativni stres prisutan u nadbubrezima usled nastalog oboljenja. Razlike u veličini tumorskih masa istakle su se kao bitan faktor u koncentraciji elemenata, pogotovo za Mn, Ni, Pb i U. Nezavisno od veličine adrenalne mase, rezultati su ukazali na to da Pb deluje kao glavni endokrini disruptor, što bi moglo istaći njegovu ulogu u patogenezi adrenalnih adenoma. Za iste elemente u uzorcima adenomatozne krvi dobijeni su suprotni rezultati, što ukazuje da bi benigne nadbubrežne mase mogle imati sposobnost da apsorbuju ciljne elemente iz krvotoka.

U poređenju sa ZAT uzorcima, PCC tkiva su imala značajno viši sadržaj Zn, Se, Na, K i Mg i niži Mn, Co, Pb i As. Krv pacijenata ukazala je na više koncentracije Na, K i Ca i niže Mn, Cu, Zn, Se i Mg. Muškarci su imali niži sadržaj esencijalnog Se i toksičnih Pb i Cd u PCC tkivu u poređenju sa ženama. Zanimljivo je istaći da su koncentracije Mn i Cu bile značajno više u PCC tkivu pušača i kod uzoraka sa veličinom adrenalne mase manjom od 5 cm. S obzirom na to da je Mn bio značajno nižih koncentracija u solidnim tkivima i punoj krvi pacijenata, treba razmotriti suplementaciju ovim elementom kod osoba obolelih od PCC.

Rezultati analize ukazali su na to da su tkiva pacijenata sa Kušingovim sindromom imala značajno više koncentracije Zn, Se, Cd, Th i Mg, dok su ZAT uzorci imali viši Ni, Na i K. Od mikroelemenata se posebno istakao Th, koji je u kontrolama bio niži čak 18 puta u odnosu na CST uzorke. U poređenju sa uzorcima pune krvi osoba obolelih od Kušingovog sindroma, kontrolni uzorci krvi imali su značajno niži Mn, Ni, As i K, dok su im koncentracije Co, Cu, Se, Pb, Na i Ca bile značajno više. Ova studija rasvetlila je do sada nepoznat elementalni status Kušingovog sindroma, što može da pomogne u boljem razumevanju ovog oboljenja nadbubrežne žlezde.

Naime, uočeno je da su se od mikroelemenata, Se, Zn i Ni izdvojili kao značajni u razdvajanju zdravog tkiva od svih obolelih, gde su Se i Zn bili značajno niži u zdravom tkivu, dok je Ni bio viši. Cu, Se, Ni i As su se istakli u razdvajanju svih uzoraka pune krvi. Uočeno je da su toksični Ni i As bili viši kod obolelih u odnosu na kontrole u punoj krvi.

Uporednom analizom sadržaja makroelemenata u uzorcima tkiva uočeno je da su se K i Mg istakli u razdvajanju zdravih tkiva od svih obolelih. Analiza uzoraka krvi ukazala je na K, Ca i Na kao elemente koji su se izdvojili u razdvajanju kontrolnih uzoraka od uzoraka krvi pacijenata.

Rezultati ove studije mogu naglasiti ulogu toksičnih i esencijalnih mikroelemenata u oboljenjima nadbubrežne žlezde. Analitičke tehnike korišćene u cilju izrade doktorske disertacije su uspešno optimizovane i primenjene u analizi humanog biološkog materijala. Takođe, prikazane analize mogle bi da pruže novi uvid u molekulsku osnovu patofizioloških promena koje proizlaze iz štetnih dejstava ovih elemenata na strukturu i funkciju nadbubrežne žlezde. Ova disertacija može poboljšati razumevanje uticaja elemenata na nadbubrege i na nastanak nadbubrežnih oboljenja. Štaviše, treba uzeti u obzir elemente koji su se istakli kao potencijalne uzročnike oboljenja, kao i sprovesti dalje studije u cilju detaljnijeg uvida u različita oboljenja nadbubrega.

## 6. LITERATURA

- Abe, S., Ohnishi, H., Tsuchiya, K., Ishizawa, K., Torii, M., Kanematsu, Y., Kawazoe, K., Minakuchi, K., Yoshizumi, M., & Tamaki, T. (2006). Calcium and reactive oxygen species mediated Zn<sup>2+</sup>-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 102, 103–111. <https://doi.org/10.1254/jphs.fp0060342>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2022). *Toxicological Profile for Copper* (Draft for Public Comment). Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2023). *Toxicological Profile for Nickel* (Draft for Public Comment). Retrieved from <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf> Nickel.
- Almeida, M. Q., Bezerra-Neto, J. E., Mendonça, B. B., Latronico, A. C., & Fragoso, M. C. B. V. (2018). Primary malignant tumors of the adrenal glands. *Clinics (Sao Paulo)*, 73, e756s. doi: 10.6061/clinics/2018/e756s.
- Andersen, J. E. T. (2017). The standard addition method revisited. *Trends in Analytical Chemistry*, 89, 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.013>.
- Aoki, K., & Terauchi, Y. (2018). Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on diabetes mellitus and obesity. In G. Litwack (Ed.), *Vitamins and Hormones* (Vol. 108, pp. 355–365). Academic Press.
- Auchus, R. J. (2014). Adrenal glands. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (2nd ed.).
- Avila, D. S., Puntel, R. L., & Aschner, M. (2013). Manganese in health and disease. *Metal Ions in Life Sciences*, 13, 199–227. doi: 10.1007/978-94-007-7500-8\_7.
- Balcaen, L., Bolea-Fernandez, E., Resano, M., & Vanhaecke, F. (2014). Accurate determination of ultra-trace levels of Ti in blood serum using ICP-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 809, 1–8.
- Bandulik, S., Tauber, P., Lalli, E., Barhanin, J., & Warth, R. (2015). Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. *European Journal of Physiology*, 467(5), 1027–1042.
- Beshir, S., Ibrahim, K. S., Shaheen, W., & Shahy, E. M. (2016). Hormonal perturbations in occupationally exposed nickel workers. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(2), 307–311. doi: 10.3889/oamjms.2016.046.
- Betts, G. J., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D., & Poe, B. (2013). Anatomy and physiology: The adrenal glands. *OpenStax*. Retrieved from: <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/17-6-the-adrenal-glands/>
- Bimonte, V. M., Besharat, Z. M., Antonioni, A., et al. (2021). The endocrine disruptor cadmium: A new player in the pathophysiology of metabolic diseases. *Journal of Endocrinological Investigation*, 44, 1363–1377. <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01502-x>.
- Bjørklund, G., Dadar, M., Chirumbolo, S., Aaseth, J., & Peana, M. (2020). Metals, autoimmunity, and neuroendocrinology: Is there a connection? *Environmental Research*, 191, 109541.
- Blanchard, A., Brailly Tabard, S., Lamaziere, A., Bergerot, D., Zhygalina, V., Lorthioir, A., Jacques, A., Hourton, D., Azizi, M., & Crambert, G. (2020). Adrenal adaptation in potassium-depleted men: Role of progesterone? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 35(11), 1901–1908. doi: 10.1093/ndt/gfz135.
- Brandao-Neto, J., de Mendonça, B. B., Shuhama, T., Marchini, J. S., Pimenta, W. P., & Tornero, M. T. (1990). Zinc acutely and temporarily inhibits adrenal cortisol secretion in humans: A preliminary report. *Biological Trace Element Research*, 24, 83–89.



- Buchman, A. R. (2014). Manganese. In A. C. Ross, B. C. Robert, J. Cousins, K. L. Tucker, & T. R. Ziegler (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* (11th ed., pp. 238–244). Lippincott Williams & Wilkins.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Tietz, N. W. (2012). *Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* (5th ed.). Elsevier.
- Burton, C., Cottrell, E., & Edwards, J. (2015). Addison's disease: Identification and management in primary care. *British Journal of General Practice*, 65(638), 488–490. doi: 10.3399/bjgp15X686713
- Bylund, D. B. (2015). Epinephrine. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.09015-2>.
- Chanoine, J. P., Wong, A. C., & Lavoie, J. C. (2004). Selenium deficiency impairs corticosterone and leptin responses to adrenocorticotropin in the rat. *Biofactors*, 20, 109–118.
- Charkiewicz, A. E., Omeljaniuk, W. J., Nowak, K., Garley, M., & Nikliński, J. (2023). Cadmium toxicity and health effects—A brief summary. *Molecules*, 28(6620). <https://doi.org/10.3390/molecules28186620>.
- Chatzellis, E., & Kaltsas, G. (2019). Adrenal incidentalomas. In K. R. Feingold, B. Anawalt, & A. Boyce (Eds.), *Endotext* (pp. 1–27). MDText.com, Inc.
- Chen, A. X., Nishimoto, K., Nanba, K., & Rainey, W. E. (2015). Potassium channels related to primary aldosteronism: Expression similarities and differences between human and rat adrenals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 417, 141–148.
- Chen, S., Liu, Y., Yan, J., Wang, C., & Lu, D. (2020). Dispersive micro-solid phase extraction with fibrous TiO<sub>2</sub>@gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocomposites coupled with ICP-MS for the determination of cobalt and nickel in environmental and biological samples. *Atomic Spectroscopy*, 41, 169–174.
- Clark, B. J., Prough, R. A., & Klinge, C. M. (2018). Mechanisms of action of dehydroepiandrosterone. In G. Litwack (Ed.), *Vitamins and Hormones* (Vol. 108, pp. 29–73). Academic Press.
- Collins, J. F. (2017). Copper: Basic physiological and nutritional aspects. In J. F. Collins (Ed.), *Molecular, genetic, and nutritional aspects of major and trace minerals* (pp. 69–83). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00007-5>.
- Costa, M. I., Sarmento-Ribeiro, A. B., & Gonçalves, A. C. (2023). Zinc: From biological functions to therapeutic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4822. doi: 10.3390/ijms24054822.
- Costello, R., Rosanoff, A., Nielsen, F., & West, C. (2023). Perspective: Call for re-evaluation of the tolerable upper intake level for magnesium supplementation in adults. *Advances in Nutrition*, 14(5), 973–982. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.06.008>.
- D'amico, M. A., Ghinassi, B., Izzicupo, P., Manzoli, L., & Di Baldassarre, A. (2014). Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocrine Connections*, 3(2), R45–R54. doi: 10.1530/EC-14-0027.
- Därr, R., Lenders, J. W., Hofbauer, L. C., Naumann, B., Bornstein, S. R., & Eisenhofer, G. (2012). Pheochromocytoma: Update on disease management. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 3, 11–26. <https://doi.org/10.1177/2042018812437356>.
- De Nys, L., Anderson, K., Ofosu, E. F., Ryde, G. C., Connelly, J., & Whittaker, A. C. (2022). The effects of physical activity on cortisol and sleep: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 143, 105843. doi: 10.1016/j.psyneuen.2022.
- Defetos, L. J. (1991). Chromogranin A: Its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocrine Reviews*, 12(2), 181–188. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-2-181>.
- Dessie, B. K., Melaku, S., Gari, S. R., Ayele, B. T., Desta, A. F., & Mihret, A. (2020). Evaluation of toxic elements in nails of tannery workers in Addis Ababa, Ethiopia. *Microchemical Journal*, 159, 105589.

- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342.
- Diederich, S., Franzen, N. F., Bahr, V., & Oelkers, W. (2003). Severe hyponatremia due to hypopituitarism with adrenal insufficiency: Report on 28 cases. *European Journal of Endocrinology*, 148, 609–617.
- Djinovic-Stojanovic, J. M., Nikolic, D. M., Vranic, D. V., Babic, J. A., Milijasevic, M. P., Pezo, L. L., & Jankovic, S. D. (2017). Zinc and magnesium in different types of meat and meat products from the Serbian market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 50–54.
- Doumouchtsis, K. K., Doumouchtsis, S. K., Doumouchtsis, E. K., & Perrea, D. N. (2009). The effect of lead intoxication on endocrine functions. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32, 175–183.
- Dreier, R., Andersen, U. B., Forman, J. L., Sheykhzade, M., Egjford, M., & Jeppesen, J. L. (2021). Effect of increased potassium intake on adrenal cortical and cardiovascular responses to angiotensin II: A randomized crossover study. *Journal of the American Heart Association*, 10(9), e018716. doi: 10.1161/JAHA.120.018716.
- Dunlavy, C. J. (2018). Introduction to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Healthy and dysregulated stress responses, developmental stress, and neurodegeneration. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 16(2), R59–R60.
- Dutt, M., Wehrle, C. J., & Jialal, I. (2023). Physiology, adrenal gland. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537260/>
- Eisenhofer, G., & Peitzsch, M. (2014). Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clinical Chemistry*, 60, 1486–1499. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224832>.
- Elbanan, M. G., Javadi, S., Ganeshan, D., Habra, M. A., Rao Korivi, B., Faria, S. C., & Elsayes, K. M. (2020). Adrenal cortical adenoma: Current update, imaging features, atypical findings, and mimics. *Abdominal Radiology (NY)*, 45(4), 905–916. doi: 10.1007/s00261-019-02215-9.
- El-Mofty, M. (1977). Adrenal control of copper mobilization and transport. *Nutrition Reviews*, 28(9), 232–234. doi:10.1111/j.1753-4887.1970.tb06240.x.
- Faroon, K. S., & Roney, O. N. (2013). *Toxicological profile for uranium*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US).
- Fassnacht, M., Terzolo, M., Allolio, B., Baudin, E., Haak, H., Berruti, A., Welin, S., Schade-Brittinger, C., Lacroix, A., Jarzab, B., Sorbye, H., Torpy, D. J., Stepan, V., Schteingart, D. E., Arlt, W., Kroiss, M., Leboulleux, S., Sperone, P., Sundin, A., et al. FIRM-ACT Study Group. (2012). Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 23, 2189–2197. doi: 10.1056/NEJMoa1200966.
- Fatoki, J. O., & Badmus, J. A. (2022). Arsenic as an environmental and human health antagonist: A review of its toxicity and disease initiation. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 100052 <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100052>.
- Felsenfeld, A. J., & Levine, B. S. (2015). Calcitonin, the forgotten hormone: Does it deserve to be forgotten? *Clinical Kidney Journal*, 8, 180-187. doi: 10.1093/ckj/sfv011.
- Ferreira, N. S., Tostes, R. C., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2021). Aldosterone, inflammation, immune system, and hypertension. *American Journal of Hypertension*, 34(1), 15–27. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa137>
- Foulon, P., & De Backer, D. (2018). The hemodynamic effects of norepinephrine: Far more than an increase in blood pressure! *Annals of Translational Medicine*, 6(Suppl 1), S25. doi: 10.21037/atm.2018.09.27.

- Fountain, J. H., & Lappin, S. L. (2021). Physiology, renin angiotensin system. In *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>.
- Fountain, J. H., Kaur, J., & Lappin, S. L. (2023). Physiology, renin angiotensin system. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Frydrych, A., Krośniak, M., & Jurowski, K. (2023). The role of chosen essential elements (Zn, Cu, Se, Fe, Mn) in food for special medical purposes (FSMPs) dedicated to oncology patients—Critical review: State-of-the-art. *Nutrients*, 15(4), 1012. doi: 10.3390/nu15041012.
- Gabry, K. E., Gold, P. W., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Introduction to physiology and pathophysiology. In *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 841–866). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50083-4>.
- Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., & Chow, C. K. (2014). Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*, 88(11), 1929–1938.
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human health and environmental toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 679. doi: 10.3390/ijerph17030679.
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3782.
- Gerspacher, C., Scheuber, U., Schiera, G., Proia, P., Gygax, D., & Di Liegro, I. (2009). The effect of cadmium on brain cells in culture. *International Journal of Molecular Medicine*, 24, 311–318. [https://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000\\_234](https://doi.org/10.3892/ijmm_00000_234).
- Gkolfinopoulos, S., Tsapakidis, K., Papadimitriou, K., Papanichael, D., & Kountourakis, P. (2017). Chromogranin A as a valid marker in oncology: Clinical application or false hopes? *World Journal of Methodology*, 7(1), 9–15. doi: 10.5662/wjm.v7.i1.9.
- Goodman, M. (2009). *Basic medical endocrinology* (4th ed., pp. 61–90). Chapter 4 - Adrenal glands. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373975-9.00004-5>.
- Goullé, J. P., Mahieu, L., Castermant, J., Neveu, N., Bonneau, L., Lainé, G., & Lacroix, C. (2005). Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. *Forensic Science International*, 153(1), 39–44.
- Grassi, G., Trevano, F. Q., Dell’Oro, R., Seravalle, G., & Mancina, G. (2019). Pheochromocytoma as a clinical model of peripheral sympathetic overdrive: Old and new findings. *Current Hypertension Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-0989-9>.
- Grassin-Delye, S., Martin, M., Hamzaoui, O., Lamy, E., Jayle, C., Sage, E., Etting, I., Devillie, P., & Alvarez, J. C. (2019). A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair, and tissues after microwave digestion. *Talanta*, 199, 228–237.
- Guan, D. X., Yang, C., & Nriagu, J. O. (2024). Editorial: The role of essential trace elements in health and disease. *Frontiers in Public Health*, 11, 1285603.
- Guarnotta, V., Amodei, R., Frasca, F., Aversa, A., & Giordano, C. (2022). Impact of chemical endocrine disruptors and hormone modulators on the endocrine system. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5710. doi: 10.3390/ijms23105710.
- Guede, I., Cruz, M., Luis, Z., Ortega, A., Alonso-Olazabal, A., Murelaga, X., Pina, M., & Gutierrez, F. J. (2017). Analyses of human dentine and tooth enamel by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to study the diet of medieval Muslim individuals from Tauste (Spain). *Microchemical Journal*, 130, 287–294.
- Gupta, P. K., & Marwaha, B. (2023). Pheochromocytoma. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589700/>.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (12th ed.). Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.

- Han, A., Olszewska, A., & Barańkiewicz, D. (2013). Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS. *Microchemical Journal*, 110, 61–69.
- Hao, Y., Yan, L., Pang, Y., Yan, H., Zhang, L., Liu, J., Li, N., Wang, B., Zhang, Y., Li, Z., Ye, R., & Ren, A. (2020). Maternal serum level of manganese, single nucleotide polymorphisms, and risk of spontaneous preterm birth: A nested case-control study in China. *Environmental Pollution*. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114187.
- Harrington, J. M., Young, D. J., Essader, A. S., Sumner, S. J., & Levine, K. E. (2014). Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: Development of a mineralomics method. *Biological Trace Element Research*, 160(1), 132–142.
- Havia, J., Pietilä, H., Niemelä, M., & Perämäki, P. (2016). Internal standardization using a dual mode sample introduction system in the determination of As by HG-ICP-MS. *Microchemical Journal*, 129, 117–122.
- Heitland, P., & Köster, H. D. (2006). Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(4), 253–262. doi:10.1016/j.jtemb.2006.08.001.
- Heitland, P., & Köster, H. D. (2021). Human biomonitoring of 73 elements in blood, serum, erythrocytes, and urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 64, 126706. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126706.
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. doi: 10.1002/cphy.c150015.
- Hinson, J. P., & Raven, P. W. (2006). Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20, 111–120.
- Hou, X., Amais, S. R., Jones, B. T., & Donati, L. G. (2016). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. In X. Hou & B. T. Jones (Eds.), *Encyclopedia of analytical chemistry* (pp. 1–25). John Wiley & Sons, Ltd.
- Hu, L., He, B., Wang, Y., Jiang, G., & Sun, H. (2012). Metallomics in environmental and health-related research: Current status and perspectives. *Chinese Science Bulletin*, 58(2), 169–176.
- Hughes, E. R., Miller, S. T., & Cotzias, G. C. (1966). Tissue concentrations of manganese and adrenal function. *American Journal of Physiology*, 211(1), 207–210. DOI: 10.1152/ajplegacy.1966.211.1.207.
- Iftikhar, K., Siddiq, A., Baig, S. G., & Zehra, S. (2020). Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders. *Neuropeptides*, 79, 101993. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101993>.
- Institute of Medicine. (2001). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press. ISBN-10: 0-309-07290-5.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1990). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Chromium, Nickel and Welding* (Vol. 49). World Health Organization. ISBN-13978-92-832-1249-2.
- Jagodić, J., Pavlović, S., Borković-Mitić, S., Perović, M., Miković, Ž., Đurđić, S., Manojlović, D., & Stojšavljević, A. (2022). Examination of trace metals and their potential transplacental transfer in pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8078. <https://doi.org/10.3390/ijms23158078>.

- Jagodić, J., Rovčanin, B., Borković-Mitić, S., Vujotić, L., Avdin, V., Manojlović, D., & Stojšavljević, A. (2021). Possible zinc deficiency in the Serbian population: Examination of body fluids, whole blood, and solid tissues. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(34), 47439–47446. doi: 10.1007/s11356-021-14013-2.
- James, M. F., & Cronjé, L. (2004). Pheochromocytoma crisis: The use of magnesium sulfate. *Anesthesia & Analgesia*, 99, 680–686. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000133136.01381.52>.
- Jarolim, L., Breza, J., & Wunderlich, H. (2003). Adrenal tumours. *European Urology*, 43(1), 1–10.
- Jason, D. S., & Oltmann, S. C. (2019). Evaluation of an adrenal incidentaloma. *Surgical Clinics of North America*. doi:10.1016/j.suc.2019.04.009.
- Jovanovic, D., Jakovljević, B., Rašić-Milutinović, Z., Paunović, K., Peković, G., & Knezević, T. (2011). Arsenic occurrence in drinking water supply systems in ten municipalities in Vojvodina Region, Serbia. *Environmental Research*, 111(2), 315–318. doi: 10.1016/j.envres.2010.11.014.
- Juárez Olgún, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E., & Barragán Mejía, G. (2016). The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9730467. doi: 10.1155/2016/9730467.
- Juszczak, A., Morris, D., & Grossman, A. (2000–). Cushing's syndrome. In *Endotext* [Internet]. MDText.com, Inc. (Last update: January 5, 2021).
- Kairys, N., Anastasopoulou, C., & Schwell, A. (2024). Cushing disease. In *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448184/>
- Kobayashi, T., Imachi, H., Sato, S., Ibata, T., Fukunaga, K., Yoshimoto, T., Kikuchi, F., Yonezaki, K., Yamaji, N., Lyu, J., Dong, T., Nagata, H., Kadota, K., Kushida, Y., Haba, R., & Murao, K. (2019). Bilateral adrenocortical adenomas along with virilization and Cushing's syndrome. *Internal Medicine*, 3, 405–409. doi: 10.2169/internalmedicine.0790-18.
- Kohrle, J., Jakob, F., Contempré, B., & Dumont, J. E. (2005). Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocrine Reviews*, 944, 944–984.
- Kotake-Nara, E., & Saida, K. (2007). Characterization of CoCl<sub>2</sub>-induced reactive oxygen species (ROS): Inductions of neurite outgrowth and endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in PC12 cells by CoCl<sub>2</sub> are ROS dependent, but those by MnCl<sub>2</sub> are not. *Neuroscience Letters*, 422, 223–227.
- Kurajoh, M., Ohsugi, K., Kakutani-Hatayama, M., Shoji, T., & Koyama, H. (2018). Hypokalemia associated with pseudo-Cushing's syndrome and magnesium deficiency induced by chronic alcohol abuse. *CEN Case Reports*, 7(1), 148–152.
- Lahera Vargas, M., & da Costa, C. V. (2009). [Prevalence, etiology, and clinical findings of Cushing's syndrome]. *Endocrinologia y Nutricion*, 56(1), 32–39. doi: 10.1016/s1575-0922(09)70191-3.
- Lanham-New, S. A., Lambert, H., & Frassetto, L. (2012). Potassium. *Advances in Nutrition*, 3(6), 820–821. doi: 10.3945/an.112.003012. PMID: 23153736; PMCID: PMC3648706.
- Larsen, B., & Sanchez-Triana, E. (2023). Global health burden and cost of lead exposure in children and adults: A health impact and economic modelling analysis. *The Lancet Planetary Health*, 7(10), e831–e840. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00166-3](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00166-3).
- Lauretta, R., Sansone, A., Sansone, M., Romanelli, F., & Appetecchia, M. (2019). Endocrine disrupting chemicals: Effects on endocrine glands. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 10, 178. doi: 10.3389/fendo.2019.00178.
- Lee, D. Y., Kim, E., & Choi, M. H. (2015). Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports*, 48(4), 209–216.

- Lepeschkin, E., Marchet, H., Schroeder, G., Wagner, R., de Paula e Silva, P., & Raab, W. (1960). Effect of epinephrine and norepinephrine on the electrocardiogram of 100 normal subjects. *The American Journal of Cardiology*, 5(5), 594–603. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(60\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0002-9149(60)90124-7).
- Leyssens, L., Vinck, B., Van Der Straeten, C., Wuyts, F., & Maes, L. (2017). Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, 387, 43–56. doi: 10.1016/j.tox.2017.05.015.
- Li, D., Dammer, E. B., & Sewer, M. B. (2012). Resveratrol stimulates cortisol biosynthesis by activating SIRT-dependent deacetylation of P450scc. *Endocrinology*, 153(7), 3258–3268.
- Li, Z., Li, X., Qian, Y., Guo, C., Wang, Z., & Wei, Y. (2020). The sustaining effects of e-waste-related metal exposure on hypothalamus-pituitary-adrenal axis reactivity and oxidative stress. *Science of the Total Environment*, 710, 139964. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.1399.
- Libé, R. (2015). Adrenocortical carcinoma (ACC): Diagnosis, prognosis, and treatment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(45). doi: 10.3389/fcell.2015.00045.
- Liu, D., Shi, Q., Liu, C., Sun, Q., & Zeng, X. (2023). Effects of endocrine-disrupting heavy metals on human health. *Toxics*, 11(4), 322. doi: 10.3390/toxics11040322.
- Lloyd, R. V. (2011). Adrenal cortical tumors, pheochromocytomas, and paragangliomas. *Modern Pathology*, 24(Suppl 2), S58–S65. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.126>
- Lönnerdal, B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of Nutrition*, 130, 1378S–1383S.
- Lonser, R. R., Nieman, L., & Oldfield, E. H. (2017). Cushing’s disease: Pathobiology, diagnosis, and management. *Journal of Neurosurgery*, 2, 404–417. doi:10.3171/2016.1.jns152119.
- Lotfi, C. F. P., Kremer, J. L., Passaia, B. S., & Cavalcante, I. P. (2018). The human adrenal cortex: Growth control and disorders. *Clinics*, 73(1), 1–14.
- Loula, M., Kaňa, A., & Mestek, O. (2019). Non-spectral interferences in single-particle ICP-MS analysis: An underestimated phenomenon. *Talanta*, 202, 565-571. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.073>.
- Lukac, N., Forgacs, Z., Duranova, H., Jambor, T., Zemanova, J., Massanyi, P., Tombarkiewicz, B., Roychoudhury, S., & Knazicka, Z. (2020). In vitro assessment of the impact of nickel on the viability and steroidogenesis in the human adrenocortical carcinoma (NCI-H295R) cell line. *Physiological Research*, 69(5), 871–883.
- Lutsenko, S. (2016). Copper trafficking to the secretory pathway. *Metallomics*, 8(9), 840–852. doi: 10.1039/c6mt00176a.
- MacFarquhar, J. K., Broussard, D. L., Melstrom, P., Hutchinson, R., Wolkin, A., Martin, C., Burk, R. F., Dunn, J. R., Green, A. L., Hammond, R., Schaffner, W., & Jones, T. F. (2010). Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Archives of Internal Medicine*, 170(3), 256–261.
- Mahmood, E., & Anastasopoulou, C. (2020). Adrenal adenoma. In *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Man, H., Bin, H., Beibei, C., & Zucheng, J. (2017). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for rare earth elements analysis. *Physical Sciences Reviews*, 2(1), 20160059. <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0059>.
- Maret, W. (2018). Metallomics: The science of biometals and biometalloids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1055, 1-20. 10.1007/978-3-319-90143-5\_1.
- Marino-Enriquez, A., & Fletcher, C. D. (2014). Shouldn’t we care about the biology of benign tumours? *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 701–702.
- Martyniak, A., & Tomasik, P. J. (2022). A new perspective on the renin-angiotensin system. *Diagnostics (Basel)*, 13(1), 16. doi: 10.3390/diagnostics13010016.

- Matusiewicz, H. (2003). Wet digestion methods. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 41, 193-233.
- Maxfield, L., Shukla, S., & Crane, J. S. (2023). Zinc deficiency. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493231/>.
- McLaughlin, P. J., & Zagon, I. S. (2012). The opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis: Homeostatic regulator of cell proliferation and its implications for health and disease. *Biochemical Pharmacology*, 84(6), 746–755. doi: 10.1016/j.bcp.2012.05.018.
- Megha, R., Wehrle, C. J., Kashyap, S., & Leslie, S. W. (2022, October 17). Anatomy, abdomen and pelvis: Adrenal glands (Suprarenal glands). In StatPearls.
- Meijs, A. C., Snel, M., & Corssmit, E. P. M. (2021). Pheochromocytoma/paraganglioma crisis: Case series from a tertiary referral center for pheochromocytomas and paragangliomas. *Hormones*, 20, 395–403. <https://doi.org/10.1007/s42000-021-00274-6>.
- Michalidou, M., & Guerrero, M. A. (2017). Clinical management of adrenal tumors (1st ed.). *IntechOpen*.
- Miller, J., & Miller, J. C. (2018). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (7th ed.). Pearson Education.
- Munir, S., Quintanilla Rodriguez, B. S., & Waseem, M. (2023). Addison disease. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441994/>.
- Murck, H. (2002). Magnesium and affective disorders. *Nutritional Neuroscience*, 5(6), 375–389.
- Murrin, C. (2007). [Met]enkephalin. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–5). Elsevier.
- Nakada, T., Koike, H., & Katayama, T. (1987). Low level of superoxide dismutase activity in pheochromocytoma. *Journal of Urology*, 138, 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)42970-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)42970-3).
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Health and Medicine Division, Food and Nutrition Board, & Committee to Review the Dietary Reference Intakes for Sodium and Potassium. (2019). Dietary reference intakes for sodium and potassium. In M. Oria, M. Harrison, & V. A. Stallings (Eds.), *Sodium: Dietary reference intakes for toxicity*. National Academies Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545426/>
- Nemergut, C. (2010). In transsphenoidal surgery, principles and pitfalls of anesthesia for transsphenoidal surgery.
- Neve, J. (1992). Clinical implications of trace elements in endocrinology. *Biological Trace Element Research*, 32(1–3), 173–185. doi:10.1007/bf02784602.
- Nikolaou, S., Qiu, S., Fiorentino, F., & Papakonstantinou, E. (2020). The role of neurotensin and its receptors in non-gastrointestinal cancers: A review. *Cell Communication and Signaling*, 18, 68. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00569-y>.
- Nishina, A., Sekiguchi, A., Fukumoto, R. H., Koketsu, M., & Furukawa, S. (2007). Selenazoles (selenium compounds) facilitate survival of cultured rat pheochromocytoma PC12 cells after serum-deprivation and stimulate their neuronal differentiation via activation of Akt and mitogen-activated protein kinase, respectively. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352, 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.025>.
- Nussey, S., & Whitehead, S. (2001). *Endocrinology: An integrated approach*. BIOS Scientific Publishers. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22/>.
- Orians, G., et al. (2000). *Copper in drinking water*. National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water. National Academies Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225407/>.

- O'Shaughnessy, K. M. (2012). Chapter 23 - Adrenergic mechanisms and drugs. In *Clinical Pharmacology* (11th ed., pp. 382–392). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4084-9.00062-8>.
- Parmar, M. S., & Singh, S. (2023). Conn syndrome. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459197/>
- Patani, A., Balram, D., Yadav, V. K., Lian, K. Y., Patel, A., & Sahoo, D. K. (2023). Harnessing the power of nutritional antioxidants against adrenal hormone imbalance-associated oxidative stress. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1271521.
- Petroff, B. K., & Greco, D. S. (2020). Cunningham's textbook of veterinary physiology (6th ed., pp. 394–427). Chapter 34 - Endocrine glands and their function. Elsevier.
- Pivonello, R., De Leo, M., Cozzolino, A., & Colao, A. (2015). The treatment of Cushing's disease. *Endocrine Reviews*, *36*(4), 385–486. doi: 10.1210/er.2013-1048.
- Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The essential toxin: Impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *7*, 1342-1365.
- Pokharel, A., & Wu, F. (2023). Dietary exposure to cadmium from six common foods in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, *178*, 113873. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113873>.
- Popović, A. R., Relić, D. J., Vranić, D. V., Babić-Milijašević, J. A., Pezo, L. L., & Dinović-Stojanović, J. M. (2017). Canned sea fish marketed in Serbia: Their zinc, copper, and iron levels and contribution to the dietary intake. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *69*, 55–60. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3069>.
- Pu, F., Chen, N., & Xue, S. (2016). Calcium intake, calcium homeostasis, and health. *Food Science and Human Wellness*, *5*, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.01.001>.
- Pupyshv, A. A., & Semenova, E. V. (2001). Formation of doubly charged atomic ions in the inductively coupled plasma. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *56*, 2397-2418.
- Qayyum, M. A., & Shah, M. H. (2019). Disparities in the concentrations of essential/toxic elements in the blood and scalp hair of lymphoma patients and healthy subjects. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-019-51973-5.
- Raff, H., & Carroll, T. (2015). Cushing's syndrome: From physiological principles to diagnosis and clinical care. *Journal of Physiology*, *593*(3), 493–506. doi: 10.1113/jphysiol.2014.282871.
- Raff, H., Sharma, S. T., & Nieman, L. K. (2014). Physiological basis for the etiology, diagnosis, and treatment of adrenal disorders: Cushing's syndrome, adrenal insufficiency, and congenital adrenal hyperplasia. *Comprehensive Physiology*, *4*(2), 739–769. doi: 10.1002/cphy.c130035.
- Raza, F. S., Okamoto, M., Takemori, H., & Vinson, G. P. (2005). Manganese superoxide dismutase activity in the rat adrenal. *Journal of Endocrinology*, *184*, 77-84.
- Ren, F., Yang, B., Cai, J., Jiang, Y., Xu, J., & Wang, S. (2014). Toxic effect of zinc nanoscale metal-organic frameworks on rat pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Journal of Hazardous Materials*, *271*, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.02.026>.
- Repić, A., Bulat, P., Antonijević, B., Antunović, M., Džudović, J., Buha, A., & Bulat, Z. (2020). The influence of smoking habits on cadmium and lead blood levels in the Serbian adult people. *Environmental Science and Pollution Research International*, *27*, 751–760.
- Rosol, T. J., Yarrington, J. T., Latendresse, J., & Capen, C. C. (2001). Adrenal gland: Structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicologic Pathology*, *1*, 41–48. doi: 10.1080/019262301301418847.
- Rossi, G. P., Pessina, A. C., & Heagerty, A. M. (2008). Primary aldosteronism: An update on screening, diagnosis, and treatment. *Journal of Hypertension*, *26*(4), 613–621. doi:10.1097/hjh.0b013e3282f4b3e6.



- Roth, J. A., Horbinski, C., Higgins, D., Lein, P., & Garrick, M. D. (2002). Mechanisms of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation. *Neurotoxicology*, 23, 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0161-813x\(01\)00077-8](https://doi.org/10.1016/s0161-813x(01)00077-8).
- Rude, R. K. (2010). Magnesium. In P. M. Coates, J. M. Betz, M. R. Blackman, G. M. Cragg, M. Levine, J. Moss, & J. D. White (Eds.), *Encyclopedia of dietary supplements* (2nd ed., pp. 527-537). Informa Healthcare.
- Rude, R. K. (2012). Magnesium. In A. C. Ross, B. Caballero, R. J. Cousins, K. L. Tucker, & T. R. Ziegler (Eds.), *Modern nutrition in health and disease* (11th ed., pp. 159-175). Lippincott Williams & Wilkins.
- Sabir, S., Akash, M. S. H., Fiayyaz, F., Saleem, U., Mehmood, M. H., & Rehman, K. (2019). Role of cadmium and arsenic as endocrine disruptors in the metabolism of carbohydrates: Inserting the association into perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114, 108802. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108802.
- Sajnog, A., Han, A., Barańkiewicz, D., Gryszczyńska, B., Majewski, W., & Iskra, M. (2019). Bioimaging of macro- and microelements in blood vessels with calcified plaque in atherosclerosis obliterans by LA-ICP-MS. *Microchemical Journal*, 150, 104090.
- Salem, A. A. S., Alshoeiby, M. H., Ahmed, B. M., & Sayed, M. M. (2019). Primary adrenal tumors in adults: A single institute 10 years' experience. *Journal of Tropical Diseases*, 7, 1–6.
- Sánchez-Martín, F. J., Valera, E., Casimiro, I., & Merino, J. M. (2010). Nerve growth factor increases the sensitivity to zinc toxicity and induces cell cycle arrest in PC12 cells. *Brain Research Bulletin*, 81, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.11.008>
- Sanders, T., Liu, Y. M., & Tchounwou, P. B. (2015). Cytotoxic, genotoxic, and neurotoxic effects of Mg, Pb, and Fe on pheochromocytoma (PC-12) cells. *Environmental Toxicology*, 30, 1445–1458. <https://doi.org/10.1002/tox.22014>.
- Sarkar, C., Basu, B., Chakroborty, D., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2010). The immunoregulatory role of dopamine: An update. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(4), 525–528. doi: 10.1016/j.bbi.2009.10.015.
- Schaefer, T., Wiedemann, C., Gitler, C., & Burger, M. M. (1994). Effects of arsenicals on the secretory process in chromaffin cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 710, 356–367. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb26642.x>.
- Schirpenbach, C., & Reincke, M. (2007). Primary aldosteronism: Current knowledge and controversies in Conn's syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*, 3, 220–227. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0430>.
- Scott, J. H., Menouar, M. A., & Dunn, R. J. (2023). Physiology, aldosterone. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470339/>
- Sheng, J. A., Bales, N. J., Myers, S. A., Bautista, A. I., Roueifar, M., Hale, T. M., & Handa, R. J. (2021). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Development, programming actions of hormones, and maternal-fetal interactions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 601939. doi: 10.3389/fnbeh.2020.601939.
- Shreenath, A. P., Hashmi, M. F., & Dooley, J. (2023). Selenium deficiency. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482260/>.
- Shulkes, A. (2004). Neurotensin. In L. R. Johnson (Ed.), *Encyclopedia of Gastroenterology* (pp. 726–730). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00504-9>.
- Singh, P. K., & Buch, H. N. (2008). Adrenal incidentaloma: Evaluation and management. *Journal of Clinical Pathology*, 61, 1168–1173.
- Smith, M. D., & Maani, C. V. (2023). Norepinephrine. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.

- Song, Q., & Li, J. (2014). A review on human health consequences of metals exposure to e-waste in China. *Environmental Pollution*, 196, 450–461.
- Song, X., Fiati Kenston, S. S., Kong, L., & Zhao, J. (2017). Molecular mechanisms of nickel-induced neurotoxicity and chemoprevention. *Toxicology*, 392, 47-54. doi: 10.1016/j.tox.2017.10.006.
- Sonme, J., Goyal, A., & Lopez-Ojeda, W. (2023). Dopamine. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Souza-Talarico, J. N., Suchecki, D., Juster, R. P., Plusquellec, P., Barbosa Junior, F., Bunscheit, V., Marcourakis, T., de Matos, T. M., & Lupien, S. J. (2017). Lead exposure is related to hypercortisolemic profiles and allostatic load in Brazilian older adults. *Environmental Research*, 154, 261–268. doi: 10.1016/j.envres.2017.01.012.
- Stachowicz, M., & Lebidzińska, A. (2016). The effect of diet components on the level of cortisol. *European Food Research and Technology*, 242, 2001–2009. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2772-3>.
- Stanford, S. C. (2013). Adrenaline and noradrenaline: Introduction. *eLS*. doi:10.1002/9780470015902.a0000271.pub3
- Stojsavljević, A., Borković-Mitić, S., Vujotić, L., Grujičić, D., Gavrović-Jankulović, M., & Manojlović, D. (2019). The human biomonitoring study in Serbia: Background levels for arsenic, cadmium, lead, thorium, and uranium in the whole blood of adult Serbian population. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 402-409. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.043.
- Stojsavljević, A., Jagodić, J., Vujotić, L., Borković-Mitić, S., Rašić-Milutinović, Z., Jovanović, D., Gavrović-Jankulović, M., & Manojlović, D. (2020). Reference values for trace essential elements in whole blood and serum samples of the adult Serbian population: Significance of selenium deficiency. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(2), 1397–1405. doi: 10.1007/s11356-019-06936-8.
- Stojsavljević, A., Rovčanin, B., Krstić, Đ., Jagodić, J., Borković-Mitić, S., Paunović, I., Živaljević, V., Mitić, B., Gavrović-Jankulović, M., & Manojlović, D. (2019). Cadmium as the main endocrine disruptor in papillary thyroid carcinoma and the significance of the Cd/Se ratio for thyroid tissue pathophysiology. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 55, 190–195.
- Stojsavljević, A., Rovčanin, M., Rovčanin, B., Miković, Ž., Jeremić, A., Perović, M., & Manojlović, D. (2021). Human biomonitoring of essential, nonessential, rare earth, and noble elements in placental tissues. *Chemosphere*, 285, 131518. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131518.
- Strazzullo, P., & Leclercq, C. (2014). Sodium. *Advances in Nutrition*, 5(2), 188-190. doi: 10.3945/an.113.005215.
- Sun, H., Xiang, P., Luo, J., Hong, H., Lin, H., Li, H. B., & Ma, L. Q. (2016). Mechanisms of arsenic disruption on gonadal, adrenal, and thyroid endocrine systems in humans: A review. *Environment International*, 95, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.020>.
- Takeda, A., & Tamano, H. (2010). Zinc signaling through glucocorticoid and glutamate signaling in stressful circumstances. *Journal of Neuroscience Research*, 88(14), 3002–3010. doi: 10.1002/jnr.22456.
- Thampi, A., Shah, E., Elshimy, G., & Correa, R. (2020). Adrenocortical carcinoma: A literature review. *Translational Cancer Research*, 9, 1253–1264. doi: 10.21037/tcr.2019.12.28.
- Thang, N. Q., Huy, B. T., Van Tan, L. E., & Phuong, N. T. K. (2017). Lead and arsenic accumulation and its effects on plasma cortisol levels in *Oreochromis* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(2), 187–193.

- Theiner, S., Grabarics, M., Galvez, L., Varbanov, H. P., Sommerfeld, N. S., Galanski, M., Keppler, B. K., & Koellensperger, G. (2018). The impact of whole human blood on the kinetic inertness of platinum(IV) prodrugs – An HPLC-ICP-MS study. *Dalton Transactions*, 47, 5252–5258.
- Thomas, R. (2008). *Practical guide to ICP-MS* (2nd ed.). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Tokar, E. J., Diwan, B. A., & Waalkes, M. P. (2012). Renal, hepatic, pulmonary, and adrenal tumors induced by prenatal inorganic arsenic followed by dimethylarsinic acid in adulthood in CD1 mice. *Toxicology Letters*, 209, 179–185.
- Toke, Ö. R., Topdağ, O., Bakırdere, S., Bursalıoğlu, E. O., Öz, E., Eyecioglu, O., Karabul, Y., & Çağla, M. (2019). Determination of Se, Cr, Mn, Zn, Co, Na, and K in blood samples of breast cancer patients to investigate their variation using ICP-MS and ICP-OES. *Atomic Spectroscopy*, 40, 11–16.
- Toker, O., Topdagi, O., Bakirdere, S., Bursalioglu, E. O., Oz, E., Eyecioglu, O., Karabul, Y., Çağlar, M., & İçelli, O. (2019). Determination of Se, Cr, Mn, Zn, Co, Na, and K in blood samples of breast cancer patients to investigate their variation using ICP-MS and ICP-OES. *Atomic Spectroscopy*, 40, 11-16.
- Tomita, A. (1998). Glucocorticoid-induced osteoporosis—Mechanisms and preventions. *Nihon Rinsho*, 56(6), 1574–1578. PMID: 9648484.
- Tong, S., von Schirnding, Y. E., & Prapamontol, T. (2000). Environmental lead exposure: A public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78, 1068–1075.
- Topdağ, O., Toker, O., Bakırdere, S., Öz, E., Bursalıoğlu, E. O., Abuqbeith, M., Demir, M., & İçelli, O. (2020). Determination of trace element concentrations in blood samples and their correlation to breast cancer. *Atomic Spectroscopy*, 41, 29–35.
- Tsirlin, A., Oo, Y., Sharma, R., Kansara, A., Gliwa, A., & Banerji, M. A. (2014). Pheochromocytoma: A review. *Maturitas*, 77, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.12.009>.
- Uezono, Y., Toyohira, Y., Yanagihara, N., Wada, A., & Taniyama, K. (2006). Inhibition by selenium compounds of catecholamine secretion due to inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 101(3), 223–229. doi: 10.1254/jphs.fp0060204.
- Val, P., & Martinez, A. (2016). Editorial: Adrenal cortex: From physiology to disease. *Frontiers in Endocrinology*, 7(1), 1–2.
- van Kaick, G., Bahner, M. L., Liebermann, D., Lührs, H., & Wesch, H. (1999). Thorotrast-induced liver cancer: Results of the German Thorotrast study. *Radiologe*, 39(8), 643-651.
- Van Saun, R. (2007). Metabolic and nutritional diseases of the puerperal period. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall (Eds.), *Current therapy in large animal theriogenology* (2nd ed., pp. 355-378). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50049-0>.
- Vanhoe, H., Goossens, J., Moens, L., & Dams, R. (1994). Spectral interferences encountered in the analysis of biological by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9. doi=303f2a4c3c41b866b95d1743d2e24f08acaba04c.
- Verberne, A. J., Korim, W. S., Sabetghadam, A., & Llewellyn-Smith, I. J. (2016). Adrenaline: Insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 173(9), 1425–1437. doi: 10.1111/bph.13458.
- Vescovi, A., Facheris, L., Zafaroni, A., Malanca, G., & Parati, E. A. (1991). Dopamine metabolism alterations in a manganese-treated pheochromocytoma cell line (PC12). *Toxicology*, 67, 129–142. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(91\)90137-p](https://doi.org/10.1016/0300-483x(91)90137-p).

- Vorkamp, K., Castaño, A., Antignac, J. P., Boada, L. D., Cequier, E., Covaci, A., Esteban López, M., Haug, L. S., Kasper-Sonnenberg, M., Koch, H. M., Pérez Luzardo, O., Osite, A., Rambaud, L., Pinorini, M. T., Sabbioni, G., & Thomsen, C. (2021). Biomarkers, matrices and analytical methods targeting human exposure to chemicals selected for a European human biomonitoring initiative. *Environmental International*, 146, 106082. doi: 10.1016/j.envint.2020.106082.
- Wang, F., Liu, J., Zhang, R., Bai, Y., Li, C., Li, B., Liu, H., & Zhang, T. (2018). CT and MRI of adrenal gland pathologies. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 8, 853–875.
- Wang, H. J., Liu, Z. P., Jia, X. D., Chen, H., & Tan, Y. J. (2014). Endocrine disruption of cadmium in rats using the OECD enhanced TG 407 test system. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27, 950–959.
- Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, J. A. (2015). Lead toxicity: A review. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(2), 55-64. doi: 10.1515/intox-2015-0009.
- Webb, S. J., Geoghegan, T. E., Prough, R. A., & Miller, K. K. M. (2006). The biological actions of dehydroepiandrosterone involve multiple receptors. *Drug Metabolism Reviews*, 38(1–2), 89–116. doi: 10.1080/03602530600569877.
- Welna, M., Szymczycha-Madeja, A., & Pohl, P. (2011). Quality of the trace element analysis: Sample preparation steps. In I. Akyar (Ed.), *Wide spectra of quality control* (pp. 53-70). InTechOpen.
- Whitworth, J. A., Mangos, G. A., & Kelly, J. J. (2000). Cushing, cortisol, and cardiovascular disease. *Hypertension*, 36(5), 912–916. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.36.5.912>
- Wils, J., Duparc, C., Cailleux, A. F., Lopez, A. G., Guiheneuf, C., Boutelet, I., Boyer, H. G., Dubessy, C., Cherifi, S., Cauliez, B., Gobet, F., Defortescu, G., Ménard, J. F., Louiset, E., & Lefebvre, H. (2020). The neuropeptide substance P regulates aldosterone secretion in human adrenals. *Nature Communications*, 11(1), 2673. doi: 10.1038/s41467-020-16470-8.
- Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively coupled plasma mass spectrometry: Introduction to analytical aspects. *Clinical Biochemistry Reviews*, 40(3), 115-133. doi: 10.33176/AACB-19-00024.
- World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). (2000). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 75). World Health Organization.
- Xing, Y., Lerario, A. M., Rainey, W., & Hammer, G. D. (2015). Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 44(2), 243–274. doi: 10.1016/j.ecl.2015.02.001.
- Yamada, K. (2013). Cobalt: Its role in health and disease. *Metal Ions in Life Sciences*, 13, 295–320. doi: 10.1007/978-94-007-7500-8\_9.
- Yamada, N. (2015). Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 110, 31-44.
- Yang, C., Zhang, X., Yin, H., Du, Z., & Yang, Z. (2020). MiR429/200a/200b negatively regulate Notch1 signaling pathway to suppress CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells. *Toxicology In Vitro*, 65, 104787. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104787>
- Yang, J. L., Chen, S., Xi, J. F., Lin, X. Y., Xue, R. Y., Ma, L. Q., Zhou, D., & Li, H. B. (2024). Sex-dependent effects of rice cadmium exposure on body weight, gut microflora, and kidney metabolomics based on a mouse model. *Science of the Total Environment*, 908, 168498.
- Yang, J., & Ma, Z. (2021). Research progress on the effects of nickel on hormone secretion in the endocrine axis and on target organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112034. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112034.

- Yang, X., Yang, Y., Li, Z., Cheng, C., Yang, T., Wang, C., Liu, L., & Liu, S. (2015). Diagnostic value of circulating chromogranin A for neuroendocrine tumors: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 10(4), e0124884. doi: 10.1371/journal.pone.0124884.
- Yang, Y., Lu, X. S., Li, D. L., & Yu, Y. J. (2013). Effects of environmental lead pollution on blood lead and sex hormone levels among occupationally exposed group in an e-waste dismantling area. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26, 474–484.
- Yiallouris, A., Tsioutis, C., Agapidaki, E., Zafeiri, M., Agouridis, A. P., Ntourakis, D., & Johnson, E. O. (2019). Adrenal aging and its implications on stress responsiveness in humans. *Frontiers in Endocrinology*, 10(1), 1–12.
- Yoshinaga-Sakurai, K., Rossman, T. G., & Rosen, B. P. (2022). Regulation of arsenic methylation: Identification of the transcriptional region of the human AS3MT gene. *Cell Biology and Toxicology*, 38(5), 765–780. doi: 10.1007/s10565-021-09611-2.
- Zdrojowy-Welna, A., & Bednarek-Tupikowska, G. (2014). Challenges in the diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma syndrome. *Neuro Endocrinology Letters*, 35, 355–358.
- Zuber, S. M., Kantorovich, V., & Pacak, K. (2011). Hypertension in pheochromocytoma: Characteristics and treatment. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40, 295–311. <https://doi.org/10.1016/j.ec1.2011.02.002>.

## 7. BIBLIOGRAFIJA

### *Objavljeni radovi i saopštenja koja čine deo doktorske disertacije*

#### **M21 – Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima**

1. **Jagodić J**, Rovčanin B, Krstić Đ, Paunović I, Živaljević V, Manojlović D, Stojsavljević A. Elemental profiling of adrenal adenomas in solid tissue and blood samples by ICP-MS and ICP-OES, *Microchem J.* (2021) 165. doi: 10.1016/j.microc.2021.106194.

#### **M22 – Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima**

1. **Jagodić J**, Rovčanin B, Paunović I, Mihailović M, Zečević N, Manojlović D, Stojsavljević A. Elemental Composition of Pheochromocytoma Resolved on Solid/Adrenal Tissue and Whole Blood Level. *Biol Trace Elem Res.* (2021) doi: 10.1007/s12011-021-02945.
2. **Jagodić J**, Rovčanin B, Paunović I, Jovanović M, Gavrović-Jankulović M, Manojlović D, Stojsavljević A. The first insight into the trace element status of human adrenal gland accompanied by elemental alterations in adrenal adenomas. *J Trace Elem Med Biol.* (2021) doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126658.

#### **M34 – Saopštenja sa skupova od međunarodnog značaja štampana u izvodu**

1. **Jovana Jagodić**, Dragan Manojlović, and Aleksandar Stojsavljević, Elemental profile assessment of the pheochromocytoma: examination of the adrenals accompanied by whole blood analysis, 2nd Online ACE Seminar on Chemistry and the Environment led by Early-career scientists, Chem2Change, Environmental Chemistry Towards Global Change, 15th - 16th March, 2022.

#### **M64 - Saopštenja sa skupova od nacionalnog značaja štampana u izvodu**

1. **Jovana Jagodić**, Branislav Rovčanin, Dragan Manojlović, Aleksandar Stojsavljević, Elemental composition of healthy adrenals and adrenal adenomas: whole blood and solid tissue analysis, X Conference of the Serbian Biochemical Society, Kragujevac, September 24 th, 2021.

## 8. BIOGRAFIJA

Jovana D. Jagodić rođena je 20. decembra 1994. godine u Somboru. Osnovnu i srednju školu (XIII beogradska gimnazija, društvenojezički smer) završila je u Beogradu. Školske 2013/14. godine upisala je osnovne akademske studije Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Završni rad na osnovnim akademskim studijama pri Katedri za Analitičku hemiju pod nazivom „Elektrohemijska kvantifikacija prirodnog alkaloida tubokurina u organskim i vodenim pomoćnim elektrolitima. Primena na realnim uzorcima.” odbranila je u 2018. godini. Master akademske studije završila je 2019. godine diplomskim radom pod nazivom „Fotokatalitičke osobine TiO<sub>2</sub> dopovanog Ce i Fe“ pri katedri za Analitičku hemiju. Doktorske akademske studije (smer: Hemija) upisala je 2019. godine pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Dragana Manojlovića, redovnog profesora i dr Aleksandra Stojsavljevića, naučnog saradnika. Od školske 2020/21. godine angažovana je kao saradnik u nastavi za izvođenje laboratorijskih vežbi na predmetu Analitička hemija u forenzici, za studijsku grupu Hemija (OAS).

Jovana D. Jagodić bavi se naučnoistraživačkim radom iz oblasti analitičke hemije i metalomike. Njen naučnoistraživački rad obuhvata metode optimizacije zasnovanih na indukovano spregnutoj plazmi sa optičkom emisionom spektrometrijom i masenom spektrometrijom za tačnu i preciznu kvantifikaciju makroelemenata, toksičnih i esencijalnih mikroelemenata u različitim kliničkim uzorcima (telesnim tečnostima, telesnim proizvodima, solidnim/vezivnim/keratinskim tkivima), kao i pronalaženje elemenata (ili elementarnih odnosa) koji bi mogao da igra značajnu ulogu u etiologiji ispitivanih humanih oboljenja.

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Јована Д. Јагодић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ ДХ01/2019 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

### Металомика бенигну оболњња набубрежне жлезде

---

---

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

### Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора           **Јована Д. Јагодић**            
Број индекса           **ДХ01/2019**            
Студијски програм           **Хемија**            
Наслов рада **Металомика бенигну оболјења**  
**надбубрежне жлезде**  
Ментори **проф др Драган Д. Манојловић и**  
**др Александар Б. Стојсављевић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### **Металомика бенигних обољења надбубрежне жлезде**

---

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

