

综述

复杂疾病的离子组学研究进展

应慧敏¹, 张焱^{2,*}

¹杭州市西溪医院内分泌科, 杭州 310023; ²深圳大学生命与海洋科学学院, 深圳 518071

摘要: 离子组学是一个研究特定生物系统中各种元素的组成、分布以及它们在不同生理、病理条件下发生变化的新兴交叉学科。它结合了高通量元素谱检测技术和生物信息学方法, 为在系统水平上深入认识这些元素的生物学利用过程与功能提供了重要新思路。越来越多的研究表明, 离子组学在复杂疾病的病因学研究、早期诊断与筛查和治疗措施制定等方面具有重要的理论与实用价值。本文着重介绍了当前离子组学在一些复杂疾病研究领域取得的新进展, 有助于我们进一步探索不同元素及其所构成的动态离子网络对疾病发生与发展的影响和相关重要属性。

关键词: 离子组; 微量元素; 复杂疾病; 生物信息学; 网络

中图分类号: Q493.7; R363; O614

Progress on ionomics of complex diseases

YING Hui-Min¹, ZHANG Yan^{2,*}

¹Department of Endocrinology, Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310023, China; ²College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518071, China

Abstract: Ionomics is a new multidisciplinary scientific field for investigating the composition and distribution of all chemical elements in specific biological systems as well as their variations under different physiological and pathological conditions. It combines both high-throughput techniques for element profile measurement and bioinformatic methods, which provides new ideas for obtaining a systems-level understanding of biological utilization and functions of these elements. More and more results of researches suggest that ionomics has important theoretical and practical values in etiological study, early diagnosis and screening, and therapeutic strategy selection for complex diseases. In this review, we focus on current advances in the ionomic studies of several complex diseases, which may help further understand the effect and important properties of individual elements, as well as their dynamic ionomic networks in the occurrence and development of diseases.

Key words: ionome; ionomics; trace element; complex disease; network

任何生物都是由众多元素所组成。除了氧、碳、氢三大基本元素以外, 生物体需要多种矿物元素来维持正常的生命活动。其中氮、磷、硫、钾、钙、钠、氯、镁等属于宏量元素, 一般在生物体中含量较高(占生物总重量万分之一以上, 人体每日摄入量大于 400 mg), 通常参与核酸和蛋白质合成、电解质平衡、信号传导、物质/能量代谢、组织成分以及

酶活化等多种生物学过程。其他元素则属于微量元素范畴, 主要包括铁、锌、铜、锰、钼、钴、镍、铬、钒、硒、氟、碘等, 它们在生物体中含量很低(人体每日摄入量不超过 20 mg), 但是与生长、发育和各种生理活动密切相关, 在抗衰老、抗病、防癌等方面发挥着重要作用^[1-3]。这些微量元素(主要是金属)广泛参与体内多种酶、辅酶、激素和核酸等

Received 2017-12-15 Accepted 2018-01-22

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31771407) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 2015A030313555).

*Corresponding author. Tel: +86-755-26536629; E-mail: zhangyan@szu.edu.cn

生物分子的合成与代谢, 在酶的催化过程中起着关键作用, 或在体内氧化还原过程中参与电子传递, 也有些在生物大分子中起稳定结构的作用^[4]。这些元素摄入不足或过多, 或相关的信号转导与代谢通路出现异常, 都会引起各种生理功能的紊乱并诱发多种疾病, 对人体健康造成严重危害甚至导致死亡^[5, 6]。目前已知, 约 30% 的疾病与微量元素代谢紊乱密切相关, 例如缺铁可引起缺铁性贫血; 缺铜与缺锌均导致免疫功能降低, 使机体易患各种感染性疾病; 过量钴可诱发红细胞增多症、心肌病和甲状腺肿大; 过量铬可诱发肺癌等。

微量元素的生物利用过程非常复杂, 包括吸收、传输、转运、存储、与蛋白结合和排出等, 该过程受到体内严格的内稳态调控。在生物体内, 这些元素主要通过与其相应靶蛋白结合并构成其活性中心, 从而参与各种生物学进程。大部分金属可直接与靶蛋白结合, 也有一小部分金属先合成特定的辅因子或复合物前体后才能与靶蛋白结合, 例如钼和钴主要是以钼喋呤和钴胺素(维生素 B₁₂) 的形式发挥重要功能^[7, 8], 而硒主要是以硒代半胱氨酸的形式被多种硒蛋白利用并构成其氧化还原反应的活性中心^[9]。此外, 一些元素之间还存在复杂的相互作用, 并影响彼此的代谢、内稳态与功能。例如, 过量的锌可以减轻铜缺乏引起的症状^[10]。因此, 生物体需要有效调节体内各种微量元素的摄入、存储和排出等过程, 才能维持细胞和机体的内环境稳定。当前, 微量元素研究被认为是关系到人类健康、长寿和疾病防治的一个充满希望的新领域, 引起了国内外生物学、化学、营养学和医学界的普遍关注。

随着以高通量测序为代表的“组学”技术的迅猛发展, 产生了海量的生物学数据(基因组、转录组、蛋白质组和代谢组等)。如何更好地利用这些大数据资源, 从中获得具有生物学意义的重要发现, 是每一个生命科学工作者所面临的迫切任务。以往研究表明, 对生物体中全部或绝大多数金属展开系统性研究可以帮助我们更好地认识金属代谢调控网络及其复杂功能, 由此产生的金属组学(metallomics) 就是这样的一个研究方向^[11]。近年来, 作为金属组学的重大扩展, 离子组学(ionomics) 正逐渐成为金属和其他矿物质研究领域中的一个新兴学科。所谓离子组(ionome) 指的是生物体内所有矿物元素的总和^[12]。离子组学的主要研究内容包括利用高通量元素分析技术对生物体内各种元素开展定量检测,

系统分析元素的组成、分布、相互关系及其变化规律, 挖掘其中蕴含的重要信息。目前离子组学的研究方法已被广泛地应用于植物遗传、生理等研究领域^[13–15], 并有望被应用于基因功能分析、离子代谢与调控机制研究乃至发育、衰老和各种生理过程等更广泛的复杂基因调控网络分析等领域。

由于各种元素(尤其是微量元素)和复杂性重大疾病(如糖尿病、癌症、心血管疾病、神经退行性疾病等)之间的密切关系日渐明了, 离子组学技术及分析方法在疾病研究领域也得到了初步应用, 这为深入研究复杂疾病发生、发展的机制和寻找治疗新靶点提供了前所未有的机遇。近年来, 针对人体若干生理、病理过程的离子组学研究已经陆续开展, 这些工作增强了人们对于不同元素及其所构成的复杂离子网络在不同条件下的组成、变化趋势与进化特征的认识。本文将对近年来复杂疾病相关的离子组学研究现状进行综述。

1 离子组学简介

离子组学研究方法早期多用于生态环境中元素组成分析, 其在生命科学领域的应用起始于植物营养研究^[16]。当前该方法仍多用于植物的正向和反向遗传学、筛选品系多样性以及生理状态建模等研究方向^[14, 15]。然而, 伴随着近年来离子组学在人类健康与疾病相关领域的迅速拓展, 其所带来的新知识和新技术变革也得到了越来越多的认可。图 1 展示了当前离子组学检测与数据分析的基本流程。

1.1 离子组学检测技术和主要资源

当前元素检测分析的主要方法都是基于原子的电子特性(如发射、吸收、荧光光谱等), 其中使用最为广泛的技术是电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 和 X 射线荧光(X-ray fluorescence, XRF) 技术。

ICP 技术原理是令待测元素的原子发生电离, 并进一步利用 ICP-MS 法或发射光谱法(inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES, 或称 inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES) 来检测。ICP-MS 是目前最常用的质谱型元素分析方法, 主要用于进行多种元素的同时测定, 并可与其他色谱分离技术联用, 进行元素价态和同位素分析。该技术克服了传统方法的大多数缺点, 具有所需样品量更少、分析精密度更高、干扰更小、分析速度更快等特点, 代表了

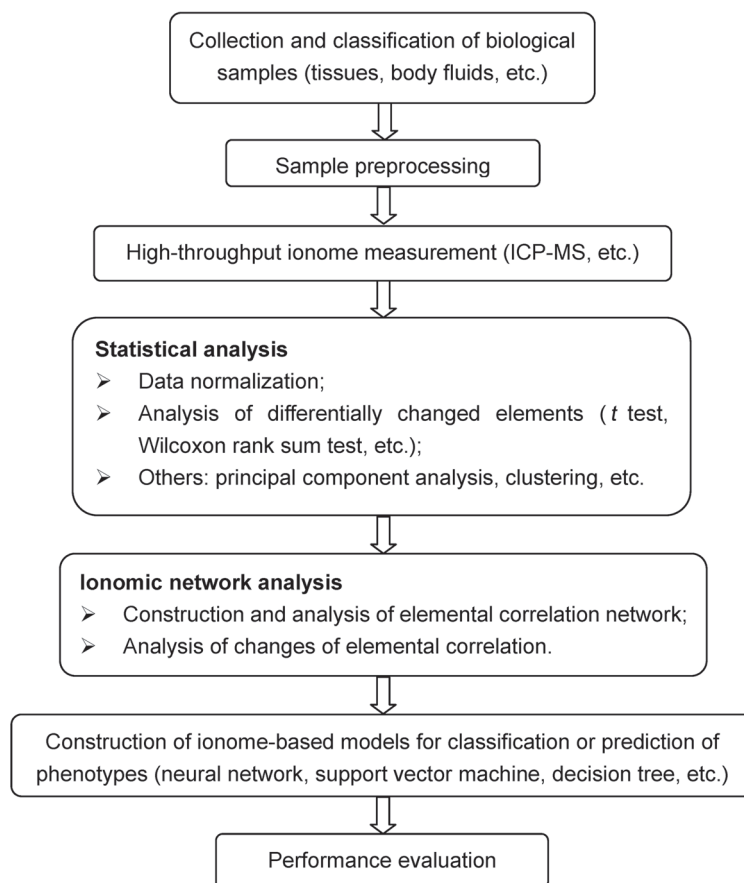


图 1. 离子组检测与数据分析流程

Fig. 1. Schematic diagram for ionome measurement and data analysis.

当代元素分析技术的重大发展^[17]。近年来, ICP-MS 和 ICP-AES 被成功用于真菌和植物的离子组学研究, 例如, Eide 等利用 ICP-AES 分析了近 5 000 个酿酒酵母突变株中的矿物质和微量元素含量, 首次揭示了酵母的离子组组成及其稳态平衡^[18]; 其他研究人员则利用 ICP-MS 技术分析了大量拟南芥样本的离子组, 建立了植物的元素谱^[16, 19, 20]。

XRF 主要原理是原子吸收高能 X 射线或 γ 射线被激发后释放出次级 X 射线 (X 射线荧光), 该 X 射线具有原子特异性的能量级, 可用来定量检测特定元素。近年来, XRF 在离子组学中的应用主要体现在基于同步加速器的 microXRF 技术, 尤其是 X 射线成像和显微光谱技术, 并可用于样品中多种元素三维空间分布的定量成像分析^[21, 22]。目前 XRF 成像技术已成为深入理解各种元素代谢与稳态平衡相关生物学过程的有力工具。

鉴于离子组学研究产生日益庞大的数据量, 相关数据管理和分析系统的研发变得越来越重要, 包括获取各种来源的数据, 对数据进行管理、存储与

检索, 以及提供各种数据分析方法和工具等。与其他组学数据的在线资源相比, 离子组学相关资源开发尚处于初始阶段, 比较有名的是 PiiMS (Purdue Ionomics Information Management System) 数据库系统^[20], 该系统 (<http://www.ionomicshub.org/home/PiiMS>) 是目前最大的离子组数据挖掘与知识发现集成系统, 包含了数据存储、分析、搜索、获取、可视化等一系列工作流程, 便于用户开展相关的数据分析工作。为了进一步认识不同元素与相关基因乃至基因网络之间的复杂关系, 利用实验或生物信息学方法获得的重要信息也应被加入离子组分析注释中。然而, 当前已有的离子组数据库系统在允许由研究人员驱动的信息注释方面开发得非常有限。随着快速增长的新元素相关基因及其功能信息的获取, 对离子组数据进行更加合理系统地管理与注释势必是今后的研究目标之一。

1.2 离子组学数据分析方法

离子组数据的主要分析方法除了基本的统计方法 (如 t 检验、秩和检验等) 外, 还包括主成分分析、

聚类分析、回归分析、判别分析和方差分析等多元统计分析方法, 这些方法同样适用于其他组学数据(如转录组、代谢组等)。一些近期的研究工作(包括我们开展的部分工作)将系统生物学和网络分析方法用于离子组数据分析, 通过构建元素相关性网络等来进一步探索不同元素间的复杂关系及其动态变化特征(研究成果将在后面介绍)。此外, 神经网络、机器学习等算法亦用于构建各种表型分类/预测模型, 有助于离子水平标志物的识别与开发。

2 离子组学在高等生物中的应用

近年来, 高通量离子组学研究主要在高等植物和酵母中开展, 取得的成果充分展示了该技术在发现微量元素代谢与稳态调控新机制和寻找基因新功能等方面具有的重要价值。比如, 在对拟南芥突变体中多种微量元素的分析工作中, 科研人员运用离子组学方法深入研究了一些已知元素代谢相关基因参与其他元素稳态调控的可能性, 找到了膜铁转运蛋白(ferroportin)和钼转运蛋白1(molybdenum transporter 1, MOT1)的新功能, 前者可参与钴的内稳态调控, 后者过去一直被认为是一种硫酸盐转运蛋白^[23–25]。此外, 一些研究针对酵母基因敲除库开展了离子组学分析, 发现大多数基因突变体都会对至少一种元素浓度产生影响, 说明酵母中存在着参与不同元素代谢的新基因(包括一些此前功能未知的基因如 *YDR065W* 等), 并且这些基因与不同元素的正负相关性亦不相同^[18, 26, 27]。这些早期研究表明, 离子组学可用于寻找元素代谢与稳态的新特征并揭示未知功能基因的潜在功能。

在高等动物(如哺乳动物)的离子组学研究中, Malinouski 等首先开发了一种可用于哺乳动物细胞快速元素分析的高通量 ICP-MS 方法, 并利用 HeLa 细胞结合转染到该细胞中的一个完整的人类基因组 siRNA 文库(超过 21 000 个基因), 对每个基因敲减都做了 18 种元素的定量分析^[28]。在数据统计分析的基础上, 结合基因网络分析并进行了二次筛选, 发现了若干与不同微量元素(如硒和铜)代谢与稳态密切相关的新基因。这是首个报道的哺乳动物细胞离子组数据库, 为深入研究哺乳动物微量元素相关的代谢与内稳态提供了重要的资源和线索。

Ma 等^[29]收集了 26 种哺乳动物的多种器官(包括脑、心、肾和肝)样品, 检测并分析了 18 种元素在这些器官中的分布、跨物种利用模式及其与体

重和寿命的关系。他们发现, 具有类似生物学功能的元素其分布特征相似, 但是不同器官中富集的元素(包括过渡金属和有毒元素)具有显著不同的分布特征。部分元素分布具有物种特异性, 例如硒在某些物种中生物利用度降低, 并且肝和肾中硒的水平与硒蛋白 P 中硒代半胱氨酸的含量呈正相关。体重与锌的浓度呈正相关, 而不同物种的寿命与肝脏中锌和镉的浓度呈正相关, 但与硒水平呈负相关。该研究为揭示哺乳动物离子组在不同器官生理、物种进化、体重和寿命等方面的变化规律提供了宝贵的信息。

3 复杂疾病的离子组学研究

复杂疾病是指在多因素共同作用下发生的疾病, 这些因素包括遗传变异、环境作用、生活方式以及其他未知的因素等, 如糖尿病、癌症、心血管病、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、哮喘、精神分裂症、自身免疫性疾病等^[30]。过去数十年的大量研究已显示, 微量元素失衡是许多复杂疾病的危险因素之一, 但是致病的内在分子机制及其效应关系尚不清楚, 需要进一步对微量元素的代谢、调控和功能展开深入研究。

在离子组学产生的多年以前, ICP-MS 已被用于检测某些疾病组织样品中部分微量元素的含量。例如, Emmett^[31]在上世纪 80 年代末期已经提出, 可以利用 ICP-MS 技术来检测 AD 患者及对照人群的脑组织、脑脊液和血清中至少 20 种元素的分布。另一项早期研究通过分析冠心病患者血液样品中 14 种微量元素的浓度, 发现患者血浆中钴浓度升高, 而铜的浓度降低^[32]。类似的初步研究还包括其他疾病, 如糖尿病、PD、病毒感染、自闭症、动脉粥样硬化和癌症等^[33–38]。这些早期工作往往局限在单个或某几个元素简单孤立的分析上, 虽然发现了一些与疾病潜在相关的元素, 但是元素之间的相互关联和作用及其构成的疾病特异性离子网络并不清楚。随着生物信息学和系统生物学理论与研究技术的迅速发展, 一些高级计算分析方法(如网络分析、机器学习等)已经开始应用于疾病离子组数据的系统性研究中。揭示不同元素之间的复杂互作关系是当前离子组学的主要研究方向, 既能帮助我们深入认识不同元素及其所构成的复杂网络在疾病发生、发展中的重要作用, 又能寻找新的生物标志物用于疾

病早期诊断与疗效监测。表 1 列出了已发表的一些复杂疾病离子组学的主要结果。下面将针对复杂疾病离子组学研究的最新进展展开论述。

3.1 糖尿病

糖尿病是一组以高血糖为主要特征的代谢性疾病，临床上可分为多个亚型，其中 90% 以上的患者属于 2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2D)，其机体内都存在不同程度的胰岛素抵抗。而微量元素与糖尿病的关系非常密切。Skalnaya 等^[39]分析了近百名

东欧 T2D 女性患者头发中多种元素含量，发现钾、钠和汞水平显著升高，而钙、镁、锌和钴显著降低。而 Flores 等^[37]分析了墨西哥 T2D 患者血清和尿液中 14 种微量元素的分布情况，首次发现了钼和铜之间的拮抗性作用可能与糖尿病并发症进展相关。最近，Badran 等^[40]利用相关性分析、聚类分析和主成分分析等多种方法深入研究了非洲 T2D 患者血清离子组，发现锌、铜、硒、铁、镁、铬等 8 种元素在 T2D 患者和健康人之间存在明显差异，尤

表1. 一些复杂疾病的离子组学结果
Table 1. Ionomic results for several complex diseases

Diseases	Population	Tissue	Increased elements	Decreased elements	Ref.
Diabetes					
T2D	Mexico	Serum	Al, Cd, Cu, Mn, Hg, Ni	Cr, Co, V	[37]
		Urine	Cr, As, Cu, Zn	Cd, Co, Pb, Mn, Mo, Ni, Se	
T2D	Russia	Hair	K, Na, Hg	Ca, Mg, Zn, Co	[39]
T2D	Egypt	Serum	Cu	Zn, Se, Fe, Mn, Cr, Mg, As	[40]
T2D	Norway	Blood	Cd, Cr, Fe, Ni, Ag, Zn	Br	[41]
T2D	China	Plasma	Cu, P, S	Mg, Cr, Se	[44]
T2D	China	Urine	Ni		[45]
T2D	China	Plasma	V, Cr, Mn, Cu, Zn, As, Se, Sr, Pd, Cd, Cs, Ba	-	[46]
T1D	Italy	Blood	Cu, Cr		[47]
Gestational diabetes	Italy	Placenta	Se	Cd	[48]
Neurodegenerative diseases					
AD	Sweden	Plasma	Mn, Hg	Co, Se, Cs	[50]
		CSF	-	V, Mn, Rb, Sb, Cs, Pb	
AD	Spain	Serum	Al, Fe	Mn, Zn, Se	[52]
AD	Turkey	Nail	-	Mn, Fe, Cu, Zn, Cd, Hg	[53]
		Hair	Na, K	Al, Mn, Fe, Co, Cu, Cd, Hg, Pb	
PD	Italy	Serum	Ca, Mg	Al, Cu	[56]
		Urine	Ca, Fe, Si	-	
PD	India	Serum	K, Mg, Cu, P	Al, S, Fe, Zn	[57]
PD	Italy	CSF	-	Co, Cr, Fe, Pb, Si, Sn	[33]
PD	China	Plasma	Fe, Se	Zn	[58]
ALS	Italy	Blood	Mn, Se, Al	As	[59]
Cancers					
Prostate cancer	China	Hair	K, Fe, Cu, Se	Mg, P, Ca, Cr, Mn, Zn	[60]
Non-small cell lung cancer	Turkey	Hair	Au, Bi, Ca, Co, Cr, Cu, Ga, Hg, K, Ni, Rb, Sb, Sc, Ti, V	Ag, Be, Cd, Fe, Zn	[61]
Pancreatic cancer	Spain	Toenail	Cd, As, Pb	Se, Ni	[62]
Laryngeal cancer	Poland	Hair/nail	Cr, Cd, Pb	Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Co	[63]
Breast cancer	USA	Urine	Cu, Pb	-	[64]
Some other diseases					
Periodontal diseases	Poland	Saliva	Cu, Mg, Mn	-	[66]
End-stage renal disease	Ukraine	Blood	B, Al, V, Cr, Mn, Zn, Sr, Cd, Ba, Pb	Ni, As, Se, Rb	[67]

T2D: type 2 diabetes; T1D: type 1 diabetes; AD: Alzheimer's disease; PD: Parkinson's disease; ALS: amyotrophic lateral sclerosis.

其是镁、铁、铜和锌四种金属与 T2D 最为相关, 提示了这些必需元素在 T2D 发生、发展过程中可能起着重要作用。上述研究表明, 不同地区或种族的 T2D 患者以及不同组织的元素分布存在着各种变异, 这也客观反映了疾病离子组数据的高度复杂性和特异性。

此外, 同一地区 T2D 患者的血液离子组在疾病的不同阶段亦存在显著差异。一个来自挪威的研究团队开展了两项 T2D 离子组学研究^[41, 42]。在一项研究中, 他们收集了 128 例早期 T2D 患者 (即此前从未被诊断为 T2D) 和 755 例对照人群的血液样本, 检测了 26 种微量元素的离子组数据, 并利用多因素 Logistic 回归等分析方法深入探讨了这些元素与 T2D 患病率的关系, 发现血中镉、铬、铁、镍、银和锌的水平升高可显著增加 T2D 的患病风险, 而溴水平增加却降低了患病率, 提示这些元素在 T2D 的发生过程中可能具有一定作用^[41]。而在另一项并行的研究中, 他们分析了 267 例此前已经确诊为 T2D 的患者和 609 例对照人群血液中 25 种微量元素的浓度, 发现 T2D 的进展过程与硼、钙和银水平呈正相关 (尤其是钙), 而与铟、铅和镁水平呈负相关^[42]。这两项研究说明, 在 T2D 发生和发展的不同阶段, 血液中的元素浓度谱具有高度动态性。

我国已成为世界第一糖尿病大国, 30 岁以上人群糖尿病患病率高达 11.6%^[43]。近年来, 我国也开展了一些糖尿病相关人群的离子组学研究。Sun 等^[44] 利用 ICP-MS 检测了近 1 000 名中年男性和女性空腹血浆中 17 种元素的浓度, 并首次利用网络分析方法, 初步探讨了血中离子网络与 T2D、肥胖和代谢综合征的复杂关系。通过互信息分析, 他们构建了疾病相关离子网络并选出了显著离子模块, 通过分析不同离子网络中的元素分布模式, 发现铜和磷与上述疾病都具有显著相关性, 为血浆离子组和各种代谢失调之间的关系提供了重要线索。Liu 等^[45] 检测了北京和上海 2 115 名 55~76 岁之间的男性和女性的尿液离子组, 发现尿中镍的水平与 T2D 的患病率呈正相关, 提示了镍暴露在糖尿病发病过程中可能具有重要的作用。最近, Li 等^[46] 分析了 122 例江苏省 T2D 初诊患者血浆中 20 种微量元素的浓度, 调整了各种干扰因素后, 发现环境重金属如锰、铜、锌、砷、钒、镉与糖尿病发病率相关, 进一步说明了环境因素对于 T2D 发病的潜在重要影响。

除了 T2D 外, 其他类型糖尿病相关的离子组学研究亦有报道。如 Peruzzi 等^[47] 分析了意大利撒丁岛 (1 型糖尿病高发区) 192 例 1 型糖尿病患者血中多种微量元素与血脂和血糖的关系, 发现锌、铁、硒与不同的脂类相关 (如锌和总胆固醇、低密度脂蛋白与甘油三酯水平呈正相关), 而铜和铬与血糖和糖化血红蛋白相关 (如男性中, 铬与空腹血糖显著相关, 铜与糖化血红蛋白显著相关)。Roverso 等^[48] 收集并综合分析了此前发表的若干妊娠糖尿病患者血液或其他样本的离子组数据, 发现除硒以外, 并没有很好的元素水平标志物可用来鉴别该疾病。他们进一步通过检测患者胎盘中的多种元素浓度, 发现低浓度的铬和高浓度的硒与妊娠糖尿病的发生密切相关, 可能是参与该疾病分子机制的两个关键元素。

3.2 神经退行性疾病

神经退行性疾病是老年人常见的慢性进行性神经系统疾病, 包括 AD、PD、亨廷顿舞蹈症和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等。多个流行病学和实验研究显示, 神经退行性疾病的发生、发展与微量元素代谢紊乱有着密切联系^[49]。下面主要介绍近年来 AD 和 PD 相关的离子组学研究进展。

AD 起病隐匿且呈进行性发展, 主要表现为记忆障碍、失语、视觉空间技能损害、认知功能障碍以及人格和行为改变等, 病因迄今未明。Gerhardsson 等^[50] 利用 ICP-MS 检测了 173 例 AD 患者和 87 例 AD 合并少量脑血管病变 (AD+vasc) 患者血浆和脑脊液中 19 种元素的浓度, 发现血浆中锰和汞在 AD 和 AD+vasc 患者中显著升高, 而脑脊液中钒、锰、铷、铯和铅的浓度则显著降低, 但在 AD 患者的血浆和脑脊液中并未发现显著一致的元素变化趋势, 说明不同体液样本的离子组存在特异性。该团队的另一项研究分析了这些元素与 AD 的主要标志物如 β 淀粉样蛋白 (A β), 总 tau 蛋白 (T-tau) 和磷酸化 tau 蛋白 (P-tau) 在脑脊液中的关系, 发现部分元素与这些 AD 标志蛋白之间存在显著相关性 (如锰与 T-tau 和 P-tau 呈正相关, 而铷与 T-tau 呈负相关等)^[51]。González-Domínguez 等^[52] 通过分析健康人、轻度认知障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 患者和 AD 患者的血清离子组, 首次探讨了痴呆发展过程中相关的离子谱变化。铁、铜、锌和铝的水平随着神经逐渐退化而呈进行性发展, 说明其代谢失衡与

认知功能损害密切相关。部分元素如锰、锂和钒只在健康人与认知功能障碍(包括MCI和AD)患者之间存在显著差异,而在MCI和AD之间无差异,说明这些元素可能与神经退行性过程的早期改变有关。上述金属的异常可能与一些重要的生物学过程(如氧化应激、脑金属稳态改变以及糖代谢受损等)相关^[52]。除了血液和脑脊液的离子组检测外,研究人员对AD患者的其他组织样本开展了研究。如Koseoglu等^[53]检测了AD不同发展阶段患者的头发和指甲样本,发现指甲中锰、铁、铜、镉等元素以及头发中钠、铝、铅、钴、铁、锰等元素与正常人相比都存在显著差异,且不同阶段的AD患者也存在特异性差异,尤其是指甲中钠的含量在AD不同阶段都存在明显差异,说明该金属对于AD进展可能具有一定作用。

虽然AD主要的病理变化发生在脑中,而且过去的研究也揭示了某些金属在脑内代谢失衡(如铁在脑中的大量积蓄)与AD关系密切,但是关于AD病变脑组织的离子组学研究仅在AD动物模型中有少数报道。Ciavardelli等^[54]检测了AD三转基因小鼠(3xTg-AD)大脑和小脑中多种元素的分布,通过与野生型小鼠比较,找出3xTg-AD小鼠中发生显著变化的元素,并首次揭示了长期补锌对3xTg-AD小鼠脑中离子组的影响。最近,本课题组亦开展了含硒化合物(硒酸钠)干预后的3xTg-AD小鼠大脑离子组学研究^[55],通过分析不同生长阶段野生型和3xTg-AD小鼠(普通饮食组和硒酸钠干预组)的大脑离子组,发现硒酸钠干预可显著降低一些元素的含量,尤其是作为AD风险因素之一的铁元素可被恢复到正常水平。此外,本课题组利用元素相关性网络构建与分析等方法,首次发现了一批显著相关的以及相关性发生显著变化的元素群,进一步揭示了大脑中硒与其他元素之间复杂的相互作用,为深入理解硒化合物在缓解或治疗AD方面的潜在机制提供了重要信息^[55]。

PD也是一种常见的中老年人神经系统变性疾病,典型症状是静止震颤、肌肉强直和运动迟缓,其主要病变在黑质和纹状体,临床上可分为不同亚型。Forte等^[56]为了寻找PD患者体液中的金属生物标志物,利用ICP-AES和ICP-MS技术分析了26例患者尿液、血清、全血和脑脊液中多种金属的浓度,发现在不同的体液中都存在显著变化的金属,如铝在PD患者所有体液样本中都降低,而钙则在

尿液、血清和全血中升高,总的来说,铁、锌、铜与PD的关系更为密切。Hegde等^[57]通过研究早期和晚期PD患者血清中的10多种元素,发现不同阶段PD患者的元素谱存在明显差异,说明在PD进展过程中元素的稳态平衡和元素之间互作会受到不同程度的干扰。Alimonti等^[33]检测了42例欧洲PD患者脑脊液中26种元素的浓度,发现钴、铬、铁、铅、硅和锡的含量显著降低,尤其是铬和铅减少了近一半。上述早期工作虽然报道了一些元素与PD之间的关系,但是由于选取的患者样本数不多,其结果很可能存在着一定偏倚。最近,本课题组与合作单位收集了来自于我国华东地区238例PD患者和302例正常对照的血样,并检测了四种可能与PD发生和发展密切相关的微量元素(铁、铜、锌和硒),首次发现血铁和硒水平下降可显著减少PD的患病率,而血锌浓度下降则是PD的一个重要危险因素^[58]。这是迄今所报道最多的PD患者血液样本数。同时基于这几种元素的浓度,我们建立了首个PD预测模型,准确率在80%以上^[58]。

除AD和PD外,最近其他一些神经退行性疾病的离子组学研究也见诸报道。如De Benedetti等^[59]分析了一些散发的ALS患者血液金属组。结合人工神经网络和机器学习等高级分析方法,他们发现高浓度的硒、锰、铝与疾病发生显著相关,而血砷的浓度变化与疾病进程呈正相关,该研究结果为认识这些元素之间的复杂相互作用及其与ALS的关系提供了参考。

3.3 癌症

关于各种元素(尤其是微量元素)与癌症之间关系的研究很早就已经开展,然而大部分早期工作局限于少数元素,尤其是有毒元素的流行病学研究(如重金属暴露)。近年来,一些癌症相关的金属组/离子组学工作逐渐开展起来,但总的来说还未得到普及和广泛重视,因此该领域研究在未来有很大的发展潜力。

Guo等^[60]检测了60例前列腺癌患者头发中的20种微量元素,并利用支持向量机算法,首次建立了基于元素谱的前列腺癌预测模型,预测准确率可达95%,为癌症离子组学的临床应用提供了新思路。Benderli等^[61]通过测定非小细胞肺癌患者头发中的多种元素含量,发现癌症患者中大多存在高浓度的钙和其他重金属以及低浓度的锌、铁和硒,并且不同元素之间的相关性在疾病和正常人之间具有一定

差异, 说明非小细胞肺癌在发生过程中可以显著影响头发中的微量元素分布及其相互关系。来自西班牙的 Amaral 等^[62]研究了脚趾甲中多种微量元素和胰腺癌患病风险的关系, 发现镉、砷和铅含量升高会显著增加胰腺癌的患病风险, 而硒和镍含量与癌症发病率呈负相关, 提示了这些微量元素在胰腺癌的发生过程中可能具有重要作用。Golasik 等^[63]深入分析了喉癌患者头发与指甲中众多必需元素和有害元素的分布, 发现正常人中含有更多的锌和铁, 而重金属含量却比患者低, 同时基于这些差异元素结合其他相关信息(如饮食和生活习惯等), 建立了可用于喉癌早期筛查和风险估计的工具。最近, Burton 等^[64]利用尿液离子组学的最新理论和方法开展了乳腺癌筛查和预防相关的病例-对照研究, 通过分析尿液样本中 22 种金属元素的浓度, 发现铜和铅在乳腺癌患者中显著升高, 可以作为疾病的潜在生物标志物。此外, 他们利用这两种金属浓度结合其他信息(如年龄等)建立了乳腺癌预测模型, 该模型具有很好的性能, 进一步说明金属组/离子组学研究有助于癌症的早期预警。

虽然癌症离子组学研究目前尚处于初始阶段, 但是其在部分癌症早期筛查和预警中的潜在作用已经逐渐显现出来, 而且对于我们进一步认识各种元素(包括必需元素和有害元素)的稳态平衡与癌症发生、发展的复杂关系提供了重要启示。

3.4 其他疾病

除了上面介绍的几类主要的复杂性疾病以外, 近年来离子组学在其他疾病研究中亦有报道^[65]。例如, Herman 等^[66]分析了牙周病患者唾液与血液中众多金属元素的含量, 发现牙周病患者唾液中的金属元素谱与正常人明显不同, 尤其是铜、镁和锰的含量在患者中显著升高, 可用于牙周病的早期诊断与预警。此外, Prodanchuk 等^[67]分析了终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)患者血液中近 20 种元素的浓度, 发现大部分元素浓度在 ESRD 患者中显著升高, 尤其是非必需元素和有害元素, 而必需元素硒则显著降低, 提示在透析治疗等过程中更应注意监测有害元素的浓度以防止其在体内积聚以及及时补硒。

4 结语与展望

在本文中, 我们主要讨论了离子组学研究在复杂疾病方面的应用前景。根据最近研究成果, 我们

对离子组学的基本概念、研究方法及其在若干复杂疾病(糖尿病、AD、PD 和癌症等)研究中的应用进行了简要介绍。疾病离子组学研究一方面可以帮助我们深入认识不同元素及其相互作用在疾病发生、发展中的复杂动态变化特征, 另一方面为相关疾病的早期诊断与风险评估等提供新思路。当前疾病离子组学研究工作仅仅是个开端, 生物信息学和系统生物学在离子组学领域中的应用非常有限, 大量信息有待进一步挖掘, 并亟需开发新的数据处理与分析方法。此外, 还有许多复杂疾病尚未开展大规模离子组学分析, 有着大量的空白需要填补。随着各种组学技术的日益普及, 未来势必将开展更多疾病相关的离子组学研究, 进一步揭示离子网络与疾病发生、发展的复杂动态关系, 并将离子组学与其他组学(基因组、转录组、蛋白质组等)数据合理地整合起来, 可为复杂疾病研究开拓新的视野并提供重要的突破手段, 促进研究成果的临床转化。

参考文献

- Mertz W. The essential trace elements. *Science* 1981; 213(4514): 1332–1338.
- Xiu YM. Trace elements in health and diseases. *Biomed Environ Sci* 1996; 9(2–3): 130–136.
- Nordberg M, Nordberg GF. Trace element research-historical and future aspects. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 38: 46–52.
- Mertz W. Review of the basis for establishing the essentiality of trace elements. *Biol Trace Elem Res* 1998; 66(1–3): 185–191.
- Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; 38(2): 232–242.
- Van Gossum A, Neve J. Trace element deficiency and toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998; 1(6): 499–507.
- Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* 2009; 460(7257): 839–847.
- Giedyk M, Goliszewska K, Gryko D. Vitamin B12 catalysed reactions. *Chem Soc Rev* 2015; 44(11): 3391–3404.
- Duntas LH, Benvenega S. Selenium: an element for life. *Endocrine* 2015; 48(3): 756–775.
- Bremner I, Beattie JH. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc* 1995; 54(2): 489–499.
- Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev* 2009; 38(4): 1119–1138.
- Baxter I. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Curr Opin Plant Biol* 2009; 12(3): 381–386.

- 13 Huang XY, Salt DE. Plant ionomics: from elemental profiling to environmental adaptation. *Mol Plant* 2016; 9(6): 787–797.
- 14 Baxter I. Ionomics: The functional genomics of elements. *Brief Funct Genomics* 2010; 9(2): 149–156.
- 15 Salt DE, Baxter I, Lahner B. Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu Rev Plant Biol* 2008; 59: 709–733.
- 16 Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, Schroeder JI, Salt DE. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 2003; 21(10): 1215–1221.
- 17 Beauchemin D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74(12): 2873–2893.
- 18 Eide DJ, Clark S, Nair TM, Gehl M, Gribskov M, Guerinot ML, Harper JF. Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 2005; 6(9): R77.
- 19 Baxter IR, Vitek O, Lahner B, Muthukumar B, Borghi M, Morrissey J, Guerinot ML, Salt DE. The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(33): 12081–12086.
- 20 Baxter I, Ouzzani M, Orcun S, Kennedy B, Jandhyala SS, Salt DE. Purdue ionomics information management system. An integrated functional genomics platform. *Plant Physiol* 2007; 143(2): 600–611.
- 21 Yun W, Pratt ST, Miller RM, Cai Z, Hunter DB, Jarstfer AG, Kemner KM, Lai B, Lee HR, Legnini DG, Rodrigues W, Smith CI. X-ray imaging and microspectroscopy of plants and fungi. *J Synchrotron Radiat* 1998; 5(Pt 6): 1390–1395.
- 22 Punshon T, Guerinot ML, Lanzirotti A. Using synchrotron X-ray fluorescence microprobes in the study of metal homeostasis in plants. *Ann Bot* 2009; 103(5): 665–672.
- 23 Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML. The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; 21(10): 3326–3338.
- 24 Mitchell CJ, Shawki A, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B. Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306(5): C450–C459.
- 25 Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot ML, Salt DE. Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). *PLoS Genet* 2008; 4(2): e1000004.
- 26 Yu D, Danku JM, Baxter I, Kim S, Vatamaniuk OK, Vitek O, Ouzzani M, Salt DE. High-resolution genome-wide scan of genes, gene-networks and cellular systems impacting the yeast ionome. *BMC Genomics* 2012; 13: 623.
- 27 Baxter I. Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? *J Exp Bot* 2015; 66(8): 2127–2131.
- 28 Malinouski M, Hasan NM, Zhang Y, Seravalli J, Lin J, Avanesov A, Lutsenko S, Gladyshev VN. Genome-wide RNAi ionomics screen reveals new genes and regulation of human trace element metabolism. *Nat Commun* 2014; 5: 3301.
- 29 Ma S, Lee SG, Kim EB, Park TJ, Seluanov A, Gorbunova V, Buffenstein R, Seravalli J, Gladyshev VN. Organization of the mammalian ionome according to organ origin, lineage specialization, and longevity. *Cell Rep* 2015; 13(7): 1319–1326.
- 30 Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 2005; 6(4): 287–298.
- 31 Emmett SE. ICP-MS: a new look at trace elements in Alzheimer's disease. *Prog Clin Biol Res* 1989; 317: 1077–1086.
- 32 Krachler M, Lindschinger M, Eber B, Watzinger N, Wallner S. Trace elements in coronary heart disease: Impact of intensified lifestyle modification. *Biol Trace Elem Res* 1997; 60(3): 175–185.
- 33 Alimonti A, Bocca B, Pino A, Ruggieri F, Forte G, Sancesario G. Elemental profile of cerebrospinal fluid in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21(4): 234–241.
- 34 Ilbäck NG, Frisk P, Tallkvist J, Gadhasson IL, Blomberg J, Friman G. Gastrointestinal uptake of trace elements are changed during the course of a common human viral (Coxsackievirus B3) infection in mice. *J Trace Elem Med Biol* 2008; 22(2): 120–130.
- 35 Hanć A, Komorowicz I, Iskra M, Majewski W, Barakiewicz D. Application of spectroscopic techniques: ICP-OES, LA-ICP-MS and chemometric methods for studying the relationships between trace elements in clinical samples from patients with atherosclerosis obliterans. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399(9): 3221–3231.
- 36 Sarafanov AG, Todorov TI, Centeno JA, Macias V, Gao W, Liang WM, Beam C, Gray MA, Kajdacsy-Balla AA. Prostate cancer outcome and tissue levels of metal ions. *Prostate* 2011; 71(11): 1231–1238.
- 37 Flores CR, Puga MP, Wrobel K, Garay Sevilla ME, Wrobel K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91(3): 333–341.
- 38 De Palma G, Catalani S, Franco A, Brighenti M, Apostoli P.

- Lack of correlation between metallic elements analyzed in hair by ICP-MS and autism. *J Autism Dev Disord* 2012; 42(3): 342–353.
- 39 Skalnaya MG, Demidov VA. Hair trace element contents in women with obesity and type 2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21 Suppl 1: 59–61.
- 40 Badran M, Morsy R, Soliman H, Elnimr T. Assessment of trace elements levels in patients with Type 2 diabetes using multivariate statistical analysis. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 33: 114–119.
- 41 Hansen AF, Simić A, Åsvold BO, Romundstad PR, Midthjell K, Syversen T, Flaten TP. Trace elements in early phase type 2 diabetes mellitus-A population-based study. The HUNT study in Norway. *J Trace Elem Med Biol* 2017; 40: 46–53.
- 42 Simić A, Hansen AF, Åsvold BO, Romundstad PR, Midthjell K, Syversen T, Flaten TP. Trace element status in patients with type 2 diabetes in Norway: The HUNT3 Survey. *J Trace Elem Med Biol* 2017; 41: 91–98.
- 43 Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M, Wang T, Wang L, Jiang Y, Dai M, Lu J, Xu M, Li Y, Hu N, Li J, Mi S, Chen CS, Li G, Mu Y, Zhao J, Kong L, Chen J, Lai S, Wang W, Zhao W, Ning G; 2010 China Noncommunicable Disease Surveillance Group. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA* 2013; 310(9): 948–959.
- 44 Sun L, Yu Y, Huang T, An P, Yu D, Yu Z, Li H, Sheng H, Cai L, Xue J, Jing M, Li Y, Lin X, Wang F. Associations between ionic profile and metabolic abnormalities in human population. *PLoS One* 2012; 7(6): e38845.
- 45 Liu G, Sun L, Pan A, Zhu M, Li Z, ZhenzhenWang Z, Liu X, Ye X, Li H, Zheng H, Ong CN, Yin H, Lin X, Chen Y. Nickel exposure is associated with the prevalence of type 2 diabetes in Chinese adults. *Int J Epidemiol* 2015; 44(1): 240–248.
- 46 Li XT, Yu PF, Gao Y, Guo WH, Wang J, Liu X, Gu AH, Ji GX, Dong Q, Wang BS, Cao Y, Zhu BL, Xiao H. Association between plasma metal levels and diabetes risk: a case-control study in China. *Biomed Environ Sci* 2017; 30(7): 482–491.
- 47 Peruzzo A, Solinas G, Asara Y, Forte G, Bocca B, Tolu F, Malaguarnera L, Montella A, Madeddu R. Association of trace elements with lipid profiles and glycaemic control in patients with type 1 diabetes mellitus in northern Sardinia, Italy: An observational study. *Chemosphere* 2015; 132: 101–107.
- 48 Roverso M, Berté C, Di Marco V, Lapolla A, Badocco D, Pastore P, Visentin S, Cosmi E. The metallome of the human placenta in gestational diabetes mellitus. *Metallomics* 2015; 7(7): 1146–1154.
- 49 Kawahara M, Kato-Negishi M, Tanaka K. Cross talk between neurometals and amyloidogenic proteins at the synapse and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Metallomics* 2017; 9(6): 619–633.
- 50 Gerhardsson L, Lundh T, Minthon L, Londos E. Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008; 25(6): 508–515.
- 51 Gerhardsson L, Blennow K, Lundh T, Londos E, Minthon L. Concentrations of metals, beta-amyloid and tau-markers in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009; 28(1): 88–94.
- 52 González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics* 2014; 6(2): 292–300.
- 53 Koseoglu E, Koseoglu R, Kendirci M, Saraymen R, Saraymen B. Trace metal concentrations in hair and nails from Alzheimer's disease patients: Relations with clinical severity. *J Trace Elem Med Biol* 2017; 39: 124–128.
- 54 Ciavardelli D, Consalvo A, Caldaralo V, Di Vacri ML, Nisi S, Corona C, Frazzini V, Sacchetta P, Urbani A, Di Ilio C, Sensi SL. Characterisation of element profile changes induced by long-term dietary supplementation of zinc in the brain and cerebellum of 3xTg-AD mice by alternated cool and normal plasma ICP-MS. *Metallomics* 2012; 4(12): 1321–1332.
- 55 Zheng L, Zhu HZ, Wang BT, Zhao QH, Du XB, Zheng Y, Jiang L, Ni JZ, Zhang Y, Liu Q. Sodium selenate regulates the brain ionome in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2016; 6: 39290.
- 56 Forte G, Bocca B, Senofonte O, Petrucci F, Brusa L, Stanzione P, Zannino S, Violante N, Alimonti A, Sancesario G. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 2004; 111(8): 1031–1040.
- 57 Hegde ML, Shanmugavelu P, Vengamma B, Rao TS, Menon RB, Rao RV, Rao KS. Serum trace element levels and the complexity of inter-element relations in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 18(2): 163–171.
- 58 Zhao HW, Lin J, Wang XB, Cheng X, Wang JY, Hu BL, Zhang Y, Zhang X, Zhu JH. Assessing plasma levels of selenium, copper, iron and zinc in patients of Parkinson's disease. *PLoS One* 2013; 8(12): e83060.
- 59 De Benedetti S, Lucchini G, Del Bò C, Deon V, Marocchi A, Penco S, Lunetta C, Gianazza E, Bonomi F, Iametti S. Blood trace metals in a sporadic amyotrophic lateral sclerosis geographical cluster. *Biometals* 2017; 30(3): 355–365.
- 60 Guo J, Deng W, Zhang L, Li C, Wu P, Mao P. Prediction of prostate cancer using hair trace element concentration and support vector machine method. *Biol Trace Elem Res* 2007; 116(3): 257–272.

- 61 Benderli Cihan Y, Oztürk Yıldırım S. A discriminant analysis of trace elements in scalp hair of healthy controls and stage-IIIB non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Biol Trace Elem Res* 2011; 144(1–3): 272–294.
- 62 Amaral AF, Porta M, Silverman DT, Milne RL, Kogevinas M, Rothman N, Cantor KP, Jackson BP, Pumarega JA, López T, Carrato A, Guarner L, Real FX, Malats N. Pancreatic cancer risk and levels of trace elements. *Gut* 2012; 61(11): 1583–1588.
- 63 Golasik M, Jawień W, Przybyłowicz A, Szyfter W, Herman M, Golusiński W, Florek E, Piekoszewski W. Classification models based on the level of metals in hair and nails of laryngeal cancer patients: diagnosis support or rather speculation? *Metallomics* 2015; 7(3): 455–465.
- 64 Burton C, Dan Y, Donovan A, Liu K, Shi H, Ma Y, Bosnak CP. Urinary metallomics as a novel biomarker discovery platform: Breast cancer as a case study. *Clin Chim Acta* 2016; 452: 142–148.
- 65 Zhang Y. Trace elements and healthcare: A bioinformatics perspective. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1005: 63–98.
- 66 Herman M, Golasik M, Piekoszewski W, Walas S, Napierala M, Wyganowska-Swiatkowska M, Kurhanska-Flisykowska A, Wozniak A, Florek E. Essential and toxic metals in oral fluid—a potential role in the diagnosis of periodontal diseases. *Biol Trace Elem Res* 2016; 173(2): 275–282.
- 67 Prodanchuk M, Makarov O, Pisarev E, Sheiman B, Kulyzkiy M. Disturbances of trace element metabolism in ESRD patients receiving hemodialysis and hemodiafiltration. *Cent European J Urol* 2014; 66(4): 472–476.