

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ ŠTURM

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ ŠTURM

**KONCENTRACIJA SELENA V KRVI PRI OTROCIH GLEDE NA TO
ALI ŽIVIJO V MESTNEM, KMEČKEM ALI OBREMENJENEM
OKOLJU**

**SELENIUM BLOOD CONCENTRATION IN CHILDREN
DEPENDING ON URBAN, RURAL OR BURDENED LIVING
ENVIRONMENT**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za koristne napotke in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Vojku Kmetcu in asist. dr. Robertu Roškarju za njihove koristne pripombe po pregledu diplomske naloge.

Najlepše pa se zahvaljujem mojim najbližjim za neizčrpno podporo v času mojega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Ljubljana, september 2008

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Član diplomske komisije: asist. dr. Robert Roškar

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	ESENCIALNI OLIGOELEMENTI.....	2
1.1.1	Fluor.....	2
1.1.2	Jod.....	3
1.1.3	Železo.....	4
1.1.4	Baker.....	4
1.1.5	Cink.....	5
1.1.6	Kobalt.....	6
1.1.7	Molibden.....	6
1.1.8	Mangan.....	7
1.1.9	Krom.....	7
1.1.10	Silicij.....	8
1.2	SELEN.....	9
1.2.1	Vnos in farmakokinetika selena.....	9
1.2.2	Toksičnost selena - selenoza.....	13
1.2.3	Selenobeljakovine v organizmu.....	13
1.2.4	Vloga selenobeljakovin v organizmu.....	15
1.3	NEESENCIALNI OLIGOELEMENTI.....	16
1.3.1	Težke kovine.....	16
1.3.2	Arzen (As) in aluminij (Al).....	20
1.4	TEORIJA POSTAVITVE REFERENTNIH VREDNOSTI.....	21
1.4.1	Pristopi za določanje mejnih odmerkov.....	22
1.4.2	Sprejemljiv interval peroralnega vnosa za esencialne oligoelemente.....	23
1.4.3	Uporaba načel za oceno tveganja s strani esencialnih oligoelementov.....	25
1.5	METODE DOLOČANJA SELENA.....	27
1.5.1	Detekcijske tehnike.....	27
2	NAMEN DELA.....	30
3	MATERIALI IN METODE.....	31
3.1	VZORCI.....	31
3.2	STATISTIČNI PROGRAM.....	31
4	EKSPERIMENTALNI DEL.....	32
4.1	ZBIRANJE PODATKOV.....	32
4.2	OBDELAVA PODATKOV.....	32
4.2.1	Skupinska analiza.....	32
4.2.2	Analiza skupinskih rezultatov.....	32
5	REZULTATI.....	33
5.1	REZULTATI PO SKUPINAH.....	33
5.1.1	Osnovna šola Žužemberk.....	33

5.1.2	<i>Osnovna šola Idrija</i>	34
5.1.3	<i>Osnovna šola Vižmarje Brod</i>	35
5.2	SKUPINSKA PRIMERJAVA REZULTATOV	35
5.2.1	<i>Test homogenosti varianc</i>	35
5.2.2	<i>Enosmerni test ANOVA</i>	36
5.2.3	<i>Razlike med spoloma</i>	37
6	RAZPRAVA	38
7	SKLEPI	41
8	LITERATURA	42
9	PRILOGA	47

POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali se koncentracije selena v krvi razlikujejo glede na to v kakšnem življenjskem okolju živimo. V ta namen smo statistično ovrednotili rezultate izmerjenih koncentracij Se v plazmi 151 deklic in dečkov starih od 7 do 9 let iz treh različnih življenjskih okolij. Preiskovani otroci so predstavljali vplive kmečkega, urbanega in s težkimi kovinami obremenjenega okolja na status selena ljudi, ki v takšnih okoljih živijo.

V diplomski nalogi smo uporabili rezultate analize koncentracije selena v plazmi otrok, ki so jo opravili leta 2007 na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Njegoševa 4/I, Ljubljana. Za statistično obdelavo zbranih podatkov smo uporabili statistični programski paket SPSS 15.0 za Windows.

Na podlagi statistične obdelave zbranih podatkov smo ugotovili, da se koncentracije Se v krvi ljudi značilno ne razlikujejo glede na to v kakšnem življenjskem okolju živimo. Idrija predstavlja obremenjeno okolje s težkimi kovinami, vendar kljub temu pri prebivalcih tega območja ni zaznati pomembnega vpliva okolja na njihov status Se. Koncentracija selena je višja pri dečkih, kot pri deklicah, ne glede na življenjsko okolje. Vendar razlika ni statistično značilna, je pa dovolj velika, da v določenih življenjskih okoljih povprečna koncentracija Se v plazmi deklic pade v referentni interval za normalno populacijo, medtem ko pri dečkih koncentracija interval presega. Povprečna koncentracija Se v plazmi 151 preiskovanih otrok je bila 102 $\mu\text{g/L}$ in tako za 1% presega referentni interval za normalno populacijo. Od leta 1996 do leta 2007 se je povprečna koncentracija Se v krvi otrok povečala. Tako so v raziskavi leta 1996 pri skupini 71 otrok določili koncentracijo Se v serumu 85 $\mu\text{g/L}$, leta 2007 pa je bila koncentracija Se v plazmi 151 otrok 102 $\mu\text{g/L}$. Zvišala se je za 20%. Tudi glede na ostale države po svetu imajo slovenski otroci relativno visoke koncentracije selena v krvi.

ABSTRACT

In this paper, an attempt was made to find out if the concentrations of selenium in human blood depend on the living environment. We have performed a statistical analysis on the results of measured selenium concentrations in plasma of 151 girls and boys, aged from 7 to 9 years, coming from three different living environments. The examined children were presenting the influence of rural, urban and with heavy metals burdened environment on the selenium status of people living in those environments.

We have used the results of plasma selenium concentration analysis made on children's plasma. This analysis was made in year 2007 by the Clinical Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry, Njgoševa 4/I, Ljubljana. Statistical analysis was carried out with SPSS software 15.0 for Windows.

On the basis of statistically analysed data it was found that the blood selenium concentrations are not significantly different from the point of view of the human living environment. Idrija presents a heavy metal burdened environment, despite this there is not any significant environment influence found to alter selenium status of Idrija's residents. Selenium blood concentration is found to be higher in boys than in girls, no matter the living environment. Despite the difference is not statistically significant it's big enough to play the role in how the Se values are fitting the reference interval for normal population. So in some living environments girls have the Se average plasma values in the reference interval at the same time boy's Se concentration exceeds that interval. Average Se plasma concentration in 151 examined children was 102 $\mu\text{g/L}$ and exceeds the referent interval for 1%. From years 1996 to 2007, children average Se blood concentration has risen. Thus in the research from year 1996 with 71 children examined, the average Se serum concentration determined was 85 $\mu\text{g/L}$. In year 2007 the average Se concentration in plasma of 151 children was 102 $\mu\text{g/L}$. Concentration has risen up for 20%. The comparison with other countries shows that slovenian children have relatively high blood selenium concentrations.

SEZNAM OKRAJŠAV

RDI	priporočen dnevni vnos
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat (reducirana oblika)
SeCys	selenocistein
SeMet	selenometionin
ppm	delcev na milijon
mRNA	obveščevalna ribonukleinska kislina
GFR	stopnja glomerulne filtracije
GSH-Px	glutation peroksidaza
TR	tiorredoksin reduktaza
ATP	adenozin trifosfat
AMP	adenozin monofosfat
LD50	50% letalna doza
ET-AAS	elektrotermična atomska absorpcijska spektrofotometrija
HG-AAS	hidridna tehnika atomske absorpcijske spektrometrije
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
ICP-AES	atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
NAA	nevtronska aktivacijska analiza

1 UVOD

Ker je učinek določene snovi odvisen od odmerka, velja staro Paracelsusovo pravilo, da je prav vsaka snov lahko hranilo, zdravilo ali strup. To pravilo velja tudi za esencialne oligoelemente, zato je izpostavljenost človeškega organizma tem snovem pomembna. Oligoelemente oziroma elemente v sledeh delimo v dve osnovni skupini:

- esencialni oligoelementi,
- neesencialni oligoelementi

Skupna značilnost obeh skupin oligoelementov je, da se v organizmu nahajajo v zelo nizkih koncentracijah, in sicer v mg/kg tkiva. Količinska prisotnost in kemijska oblika vseh oligoelementov v organizmu je pomembna za normalno delovanje organizma. Pri tem pa je za esencialne oligoelemente biokemijska vloga znana, in njihovo pomankanje ali presežek vodi v poslabšanje življenjskih funkcij. Neesencialni oligoelementi so sicer v človeškem, kot tudi v živalskih organizmih prisotni, a njihova bistvena biokemijska funkcija (še) ni poznana. Tako pomankanje esencialnih oligoelementov, kot tudi njihov presežek v organizmu vodi v različna bolezenska stanja. V primeru neesencialnih oligoelementov pa je biološko pomembna le njihova (previsoka) prisotnost v organizmu. Na vnos oligoelementov v organizem in njihovo biorazpoložljivost vpliva množica faktorjev. Pomemben vpliv na vnos oligoelementov v organizem ima njihova koncentracija v življenjskem okolju človeka. Njihova različna koncentracijska prisotnost v okolju je tako naravna, kot tudi antropogena - plod človeške dejavnosti, na katero lahko vplivamo. Na vnos posameznega elementa v organizem vpliva njegova količinska prisotnost v naravi (zraku, zemlji, pitni vodi, hrani) in njegova kemijska oblika. Pri tem pa ni pomembna le koncentracija posameznega elementa v naravi, ampak tudi razmerje le-tega do ostalih elementov, saj imajo medsebojen vpliv na biorazpoložljivost. Na primer: živo srebro po vstopu v organizem inhibira sintezo selenoproteinov s tvorbo kompleksa Se-Hg [1].

Selen je esencialen oligoelement in ima kot sestavni del nekaterih biološko pomembnih proteinov pomembne funkcije v organizmu. Za vse pozitivne funkcije selena je ključnega pomena njegova optimalna prisotnost v organizmu. Tako previsok, kot tudi prenizek vnos selena v organizem zniža njegovo koristno biološko vlogo.

1.1 ESENCIALNI OLIGOELEMENTI

Kriterij za esencialnost oligoelementa

Kriterij za esencialnost določenega elementa za človekovo zdravje je, da odsotnost ali pomanjkanje tega elementa v prehrani povzroči funkcijske ali strukturne nenormalnosti in da so nenormalnosti povezane z, ali posledica, specifičnih biokemijskih sprememb, ki so reverzibilne v prisotnosti esencialnega elementa [2]. Biokemijska vloga esencialnih oligoelementov je znana. Vloga posameznega elementa ne more biti nadomeščena z drugim elementom. V nadaljevanju so na kratko predstavljeni vsi oligoelementi, s poudarkom na selenu. Vsi esencialni in neesencialni oligoelementi so v organizmu in naravi najpogosteje prisotni v ionizirani obliki in praviloma vezani z ostalimi kemijskimi elementi.

1.1.1 Fluor

Fluor (F) je enovalenten strupen plinast halogen, je blede rumeno-zelene barve ter je najbolj kemijsko reaktiven in elektronegativen od vseh elementov [3]. F z lahkoto tvori spojine z večino ostalih elementov. V vodnih raztopinah se pogosto nahaja v obliki F^- iona.

V naravi se nahaja v zemeljski skorji, kjer ga najdemo v kameninah, premogu in glini. Fluoridi se sproščajo v zrak s preprihavanjem zemlje. Fluor je trinajsti najpogostejši element v zemeljski skorji (950 ppm). Povprečna koncentracija F v tleh je 330 ppm, in se giblje od 150 do 400 ppm. Na nekaterih področjih ga zemlja vsebuje do 1000 ppm, kontaminirana pa tudi do 3500 ppm. Vodikov fluorid se lahko sprošča v zrak preko izgorevanja v industriji. Vsi fluoridi, ki se nahajajo v zraku pa na koncu pristanejo na kopnem ali pa v vodi. Če se fluor pritrdi na zelo majhne delce lahko ostane v zraku zelo dolgo.

Ljudje smo izpostavljeni fluoru preko hrane, pitne vode in preko vdihavanja zraka. F najdemo v vsaki hrani v zelo nizkih koncentracijah. Večje koncentracije pa lahko najdemo v lupinarjih (školjkah, polžih in rakih). F je esencialen element za vzdrževanje trdnosti kosti [3]. V območjih, kjer vsebuje pitna voda manj kot 1 ppm (0,7-1,2 mg/L) fluora, se

pogosteje pojavlja zobni karies. Fluorirana pitna voda predstavlja 1-2 mg dnevnega vnosa fluora. V območjih, kjer vsebuje pitna voda več kot 3 mg/L fluora lahko pride do previsokega vnosa fluora, kar privede do propadanja zob, osteoporoze in poškodbe ledvic, kosti, živcev in mišic. V obliki plina se fluor sprošča iz industrije in lahko v zelo visokih koncentracijah povzroči smrt, pri nizkih koncentracijah pa draži oči in nos. Priporočen dnevni vnos fluora za odrasle (RDI - Recommended Daily Intake) je 3,5 mg [5]. Fluor ni mutagen, kancerogen, za možno teratogeno delovanje pa še ni zanesljivih dokazov.

1.1.2 Jod

Jod (I) je nekovinski, temno-siv/vijolično-črn, lesketajoč, trden element. Je najbolj elektropozitiven halogen in najmanj reaktiven med halogeni, čeprav še vedno lahko tvori spojine z mnogimi elementi. Ob segrevanju jod z lahkoto sublimira v obliki vijolične pare. Jod je topen v nekaterih topilih, kot je tetraklorometan, in je slabo topen v vodi [6].

I se nahaja v skoraj vseh uporabljenih solih. V naravi se nahaja v morju, morskih ribah in rastlinah, v zraku in zemlji. Najpomembnejši vir joda so oceani. Na leto se iz morja izloči okoli 400 000 ton I v obliki vodnega prahu ali jodida ter metil jodida, ki ga proizvajajo morske ribe. Večina se ga potem izloči na kopno, kjer postane del biocikla.

Jod sestavlja ščitnične hormone, ki so nujno potrebni za rast, živčni sistem in presnovo. Pri pomankanju joda v organizmu se zniža delovanje žleze ščitnice in ščitnica začne otekati. Ta fenomen se imenuje struma - golša. Takšno stanje je danes redko, saj sol jodiramo. Elementarni jod, I₂, je toksičen. Njegova para draži oči in pljuča. Najvišja dovoljena koncentracija joda v zraku na delovnem mestu je 1 mg/m³ [6]. Vsi jodidi so toksični če se zaužijejo v preveliki količini. Dalj časa trajajoče vnašanje previsokih količin joda vodi do toksičnega sindroma - jodizma. Pri tem pride do hipersalivacije, prehlada, kihanja, konjunktivitisa, stomatitisa, parotitisa, povečanja podčeljustne žleze slinavke in kožnih izpuščajev [8]. Smrtna doza je okoli 2 ali 3 g [9]. Hipotenzija, tahikardija, cianoza in znaki šoka so pogosti simptomi zaužitja joda. Ni dokazov o kancerogenosti in mutagenosti joda. Priporočljiv dnevni vnos (RDI) je 150 µg [5]. Z jodom bogata hrana je morska hrana in jodirana sol.

1.1.3 Železo

Železo (Fe) je lesketajoča, kovna, srebrno-siva kovina. Nahaja se v štirih različnih kristalnih oblikah. Raztaplja se v razredčenih kislinah. Železo je kemijsko reaktiven element in oblikuje serijo kemijskih spojin, ki vsebujejo dvo- ali trivalentno železo [10].

Pedvideva se, da je železo deseti najbolj razširjen element v vesolju. Železo predstavlja največji delež mase Zemlje. Koncentracija železa v različnih plasteh Zemlje se giblje od visoke v notranjosti do okoli 5% na zunanji skorji. Največ se ga nahaja v različnih oksidih, kot so minerali hematit, magnetit in takonit. Železo je esencialen element za skoraj vsa živa bitja, od mikroorganizmov do ljudi.

Železo najdemo v mesu, črni moki, krompirju in zelenjavi. Organizem lažje absorbira železo iz mesa (Fe II), kot iz hrane rastlinskega izvora (Fe III). Železo je sestavni del hemoglobina. Kronično vdihavanje prekomerne koncentracije železovih oksidov lahko povzroči siderozo. Vdihavanje prekomerne koncentracije železovih oksidov lahko poveča možnost nastanka pljučnega raka pri delavcih, ki so takšnim koncentracijam izpostavljeni na delovnem mestu. 50% oralna (podgana) letalna doza (LD50) je 30 mg/kg. Odmerki večji od 20 mg lahko povzročijo okvaro želodca in zaprtost. Bolj pogosta težava pri ljudeh je pomankanje železa, kar lahko vodi v anemijo. Priporočen dnevni vnos je 15 mg železa, ki ga z uravnoteženo prehrano tudi dosežemo [5].

1.1.4 Baker

Baker (Cu) je rdečkasta kovina s kubično kristalno strukturo. Odbija svetlobo rdeče in oranžne barve in absorbira ostale frekvence vidnega spektra. Je koven in izredno dober prevodnik toplote in elektrike. Je mehkejši od železa a trši kot cink. Lahko ga spolitamo do svetlega sijaja. Baker ima nizko kemijsko reaktivnost. V vlažnem zraku počasi dobi zelenkasto površino - film imenovan patina, ki ga varuje pred nadaljnim propadanjem [11].

Baker je zelo pogosta kovina, ki se v okolju naravno pojavlja in širi v okolje skozi naravne procese. Uporaba bakra je široka. Proizvodnja bakra se je v zadnjih desetletjih povečala, zaradi česar se je njegova prisotnost v okolju razširila. Reke odlagajo gosto, z bakrom onesnaženo usedlino v jezovih zaradi izpuščanja z bakrom onesnažene odpadne vode. Baker vstopi v zrak pretežno z izgorevanjem fosilnih goriv. Iz zraka ga izpira dež, tako lahko zemlja vsebuje velike količine bakra prinešenega z zrakom. V okolje se baker

sprošča naravno in s človeško dejavnostjo. Naravni viri sproščanja so z vetrom prenešen prah, propadanje vegetacije, gozdni požari in morski prah. Topne bakrove spojine so najbolj nevarne za človekovo zdravje.

Baker lahko najdemo v hrani vseh vrst, v pitni vodi in zraku. Tako smo bakru izpostavljeni preko uživanja hrane, pitja in dihanja. Baker je esencialni element za človekov organizem, zato je absorpcija bakra nujna. Koncentracije bakra v zraku so običajno nizke, zato je vnos bakra preko dihanja neznamen. Ljudje, ki živijo v hišah, ki imajo še vedno bakreno vodovodno instalacijo so izpostavljeni višjim koncentracijam bakra, saj se baker izloča v njihovo pitno vodo preko razjedanja cevi. Pogosta je poklicna izpostavljenost bakru. Na delovnem mestu lahko škodljivi vplivi bakra vodijo do gripi podobemu stanju, poznanemu tudi kot kovinska mrzlica. Takšno stanje mine po dveh dneh in je posledica preobčutljivosti [11]. Dolgotrajna izpostavitve bakru lahko povzroči draženje nosu, ust in oči, lahko povzroči glavobole, bolečine v želodcu, vrtoglavico in drisko. Nameren vnos visokih koncentracij bakra povzroči okvaro jeter in ledvic, lahko pa povzroči celo smrt. Glede karcinogenega vpliva bakra še ni zanesljivih podatkov. Obstajajo znanstveni članki, ki nakazujejo povezavo med dolgoročno izpostavljenostjo visokim koncentracijam bakra in upadu inteligence pri mladih adolescentih. Kronična zastrupitev z bakrom povzroča Wilsonovo bolezen, pri kateri pride do jeterne ciroze, poškodbe možganov, demielinizacije, ledvične bolezni in odlaganja bakra v roženici. Priporočljiv dnevni vnos bakra znaša 2 mg [5].

1.1.5 Cink

Cink (Zn) je lesketajoča modrikasto bela kovina. Pri sobni temperaturi je krhek kristal. Je precej reaktivna kovina, ki reagira s kisikom in drugimi nekovinami. Med reakcijo cinka z razredčenimi kisljinami se sprošča vodik.

Cink je zelo razširjen element v naravi. Nahaja se v zraku, vodi in zemlji. V nizkih koncentracijah ga vsebuje veliko živil. Pitna voda vsebuje določeno koncentracijo cinka, ki pa je lahko večja, če je shranjena v kovinskih rezervoarjih. Industrijski viri ali mesta z odpadki lahko prispevajo h koncentracijam Zn v pitni vodi, ki že povzročajo zdravstvene težave.

Cink je esencialni element za človekovo zdravje. Pri prenizki absorpciji cinka pride do izgube apetita, znižanega zaznavanja okusa in vonja ter počasnejšega celjenja ran.

Pomankanje cinka lahko povzroči poškodbo ploda. Posledice previsokega vnosa cinka v organizem povzroča želodčne krče, draženje kože, bruhanje, slabost in anemijo. Zelo visoke koncentracije cinka poškodujejo trebušno slinavko, motijo presnovo beljakovin in povzročajo arteriosklerozo. Priporočen dnevni vnos cinka je 15 mg [5].

1.1.6 Kobalt

Kobalt (Co) je v okolju široko zastopan. Nahaja se v zelenjavi, ki predstavlja glavni dnevni vnos kobalta pri človeku. Hrana živalskega izvora, zlasti jetra, vsebujejo kobalt v obliki vitamina B₁₂ (kobalamin). Element je prisoten tudi v zraku, vodi in tobačnemu dimu. Pri bolnikih, ki so implantirani z vsadki, zgrajenimi iz kobaltovih zlitin, imajo lahko povečano koncentracijo kobalta v tkivih, serumu in urinu.

Co je integralni del vitamina B₁₂, ki je potreben za sintezo mielina in celic, potreben je za presnovo maščob, ogljikovih hidratov, sintezo proteinov in pretvorbo folata v aktivno obliko. Povprečni človek vsebuje 2-5 mg vitamina B₁₂, največ ga je v jetrih. Obstajajo primeri bolnikov z malignimi tumorji, največ s sarkomi, na mestih ortopedskih vsadkov, ki so vsebovali kobaltovo zlitino. Prevelike količine kobalta v telesu povzročajo astmo, anksioznost, kongestivno srčno popuščanje, nenormalno delovanje žleze ščitnice, policitemijo in prekomerno eritropoezo. Priporočen dnevni vnos (RDI) kobalta znaša 10-20 µg [12].

1.1.7 Molibden

Molibden (Mo) je srebrno bela, zelo trda prehodna kovina. Mo ima eno izmed najvišjih temperatur tališča med čistimi elementi (2610°C). Od ostalih oligoelementov se molibden razlikuje po tem, da je manj topen v kisli zemlji in bolj topen v alkalni. Tako vsebujejo nekatere rastline, ki rastejo na alkalnih tleh do 500 ppm kobalta.

Molibden in njegove spojine so zelo toksične. Obstajajo primeri delavcev z okvarami jeterne funkcije s hiperbilirubinemijo, ki so bili kronično izpostavljeni molibdenu. Prekomerna koncentracija Mo v organizmu povzroča znake protina, bolečine v sklepih kolen, rok, nog, deformacije sklepov, eritem in edem na predelih sklepov. Priporočen dnevni vnos (RDI) molibdena je 75 µg [5].

1.1.8 Mangan

Mangan (Mn) je rožnato siv, kemijsko reaktiven element. Je trda in krhka kovina, ki rada oksidira. Čisti mangan v prahu gori s kisikom, reagira z vodo in se raztopi v razredčenih kislinah. V naravi se nahaja v obliki oksidov in hidroksidov in kroži skozi različna oksidacijska stanja. Mangan je esencialni element za vse organizme. Ribe lahko vsebujejo do 5 ppm in sesalci do 3 ppm mangana v tkivu, normalno pa okoli 1 ppm.

Glavna pot vnosa mangana v človeški organizem je preko hrane in pijače, kot je špinača, čaj in zelišča. Hranila, ki vsebujejo največ mangana so riž, soja, žitarice, fižol, jajca, oreščki, olivno olje in ostrige. Simptomi zastrupitve z manganom so halucinacije, pozabljivost in površnost. Prav tako pa lahko povzroči Parkinsonovo bolezen, pljučni embolizem in bronhitis. Ob kronični izpostavljenosti manganu lahko moški postanejo neplodni. Sindromi, ki jih povzroči mangan imajo simptome shizofrenije, zaspanost, mišično oslabelost, glavoboli in nespečnost. Priporočen dnevni vnos mangana znaša 5 mg [5].

1.1.9 Krom

Krom (Cr) je svetleča, lomljiva in trda kovina srebrno sive barve. Je nestabilen na kisiku, na površini se hitro naredi oksidna plast, ki je neprepustna za kisik in ga tako pred njim varuje.

Ljudje smo kromu izpostavljeni preko dihanja, uživanja hrane in vode ter preko stika kože s kromom in njegovimi spojinami. Običajno je njegova koncentracija v zraku in vodi nizka. V trivalentni obliki se krom nahaja v zelenjavi, sadju, mesu, kvasu in žitaricah, zato Cr(III) predstavlja glavno zaužito obliko kroma pri ljudeh. Cr(III) je esencialno hranilo za človeški organizem, ker njegovo pomanjkanje povzroči težave v presnovi, delovanju srca in diabetes, previsoka koncentracija Cr(III) pa povzroča kožne izpuščaje. Krom(IV) je za človekovo zdravje nevaren, najbolj za ljudi, ki delajo v kovinski in tekstilni industriji ter za kadilce. Znano je, da Cr(IV) povzroča alergične reakcije, kot so kožni izpuščaji, v primeru vdihavanja pa povzroča draženje nosne sluznice in krvavitev iz nosu. Priporočen dnevni vnos kroma znaša 120 µg [5].

1.1.10 Silicij

Silicij (Si) je metaloid. V spojinah je običajno v štirivalentni obliki, čeprav ga najdemo tudi v dvovalentni, petvalentni in šestvalentni obliki.

Silicij je razmeroma nov član skupine esencialnih oligoelementov. V telesu je prisoten v obliki derivatov silicijeve kisline in je potreben za optimalno rast in učinkovito proizvodnjo mukopolisaharidov ter kolagena v opornih tkivih. Si igra pomembno vlogo pri prečnem povezovanju mukopolisaharidov in proteinov. S tem poveča trdnost in zmanjša permeabilnost zunajceličnega matriksa v opornih tkivih, aorti in ostalih arterijah, traheji, kitah, kosteh in koži. Silicij ima vlogo katalizatorja v mineralizaciji nove kostnine. Si tako podpira proces zdravljenja in pomaga izgraditi imunski sistem. Simptomi ob pomankanju Si se izražajo z nenormalnostmi opornega tkiva in kosti. Največ silicija zaužijemo s trdo vodo, vinom, neprečiščenimi žitaricami z visoko vsebnostjo vlaknin, oreščki in jabolki [61]. Trenutno RDI za silicij še ni določen, najpogosteje pa ugledni viri navajajo vrednosti 5-20 mg Si na dan.

1.2 SELEN

Selen (Se) je element, ki se nahaja v šesti skupini periodnega sistema med žveplom in telurjem in sodi med metaloide, saj nosi tako lastnosti kovin kot nekovin. V naravi je prisotnih 6 naravnih izotopov selena (^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se), od katerih največji delež predstavlja ^{80}Se [13]. Selen je sestavni del mnogih anorganskih spojin, v katerih nastopa v različnih oksidacijskih stanjih: 0 (elementarni Se), -2 (selenid), +2 (tioselenat), +4 (SeO_3^{2-} - selenit), +6 (SeO_4^{2-} - selenat). V naravi je vezan tudi v organskih spojinah: selenocistein, selenocistin, Se-metilselenocistein, selenometionin, Se-metilselenometionin, selenosečnina, dimetil selenid, dimetil diselenid, selenoholin, selenobetain, selenohomocistin, selenocistationin, itd. [14]. Selenit in selenat sta dobro poznana vira anorganskega selena, medtem ko sta selenocistein (SeCys) in selenometionin (SeMet) v proteinih, najpogostejša vira organskega selena v hrani. SeCys je prisoten kot aminokislinski preostanek v selenoproteinih (seleno-encimih) v rastlinah in živalih (v zelenjavi in mesu), in je vgrajen v aminokislinsko zaporedje preko specifičnega kodona za SeCys preostanek. Po drugi strani pa je selenometionin (SeMet) prisoten v obliki SeMet preostanka v običajnih proteinih brez razločevanja med SeMet in Met pri vgradnji v aminokislinsko zaporedje [15].

V naravi prisotne organske selenove spojine so zelo pomembne, saj imajo pomembno vlogo v celični biokemiji. Podobne, vendar ne identične, so žveplovim organskim spojinam, zato lahko pride v bioloških sistemih do zamenjave žveplovih in selenovih organskih spojin. Selen je pri fiziološkem pH v aminokislinah večinoma disociiran v selenidni obliki, žveplo pa v -SH obliki, zato so selenove spojine boljši nukleofili kot žveplove analogne spojine. Posledica je predvsem drugačna presnova teh spojin in drugačna biološka aktivnost [16].

1.2.1 Vnos in farmakokinetika selena

Ljudje smo dnevno izpostavljeni nizkim koncentracijam selena preko hrane, vode in zraka. Glavni del dnevnega vnosa selena v organizem predstavlja hrana, vnos z vodo predstavlja le manjši del. Pri tem pa se je potrebno zavedati, da je vsebnost selena v hrani zelo variabilna, ker je močno odvisna od lastnosti zemlje iz katere izvira. Iz tega razloga so nekateri raziskovalci zaključili, da ni mogoče ustvariti veljavnega seznama hranil in njihovih vsebnosti selena. Medtem, ko lastnosti zemlje direktno vplivajo na absorpcijo

selena v rastline, pa slednje vplivajo na vsebnost selena v hrani živalskega izvora, saj je večina živali rastlinojedih [17]. SeCys je prisoten v beljakovinah živalskega izvora, SeMet pa v beljakovinah rastlinskega izvora. Anorganske selenove spojine so prisotne v hrani le kot dodatek ali kontaminant [16]. Brazilski oreščki so najbolj koncentriran vir selena [17]. En povprečni brazilski orešček vsebuje 50 µg selena. Bogati viri selena so pšenični kalčki, otrobi, rjavi riž, polnozrnat kruh, ječmen, čebula, česen, repa, soja, gobe, ribe in jajca [18]. Po priporočilih, ki veljajo v Nemčiji, Avstriji, Švici in Sloveniji, znaša priporočen dnevni vnos selena za odrasle ženske in moške med 30 in 70 µg/dan (tabela 1) [19].

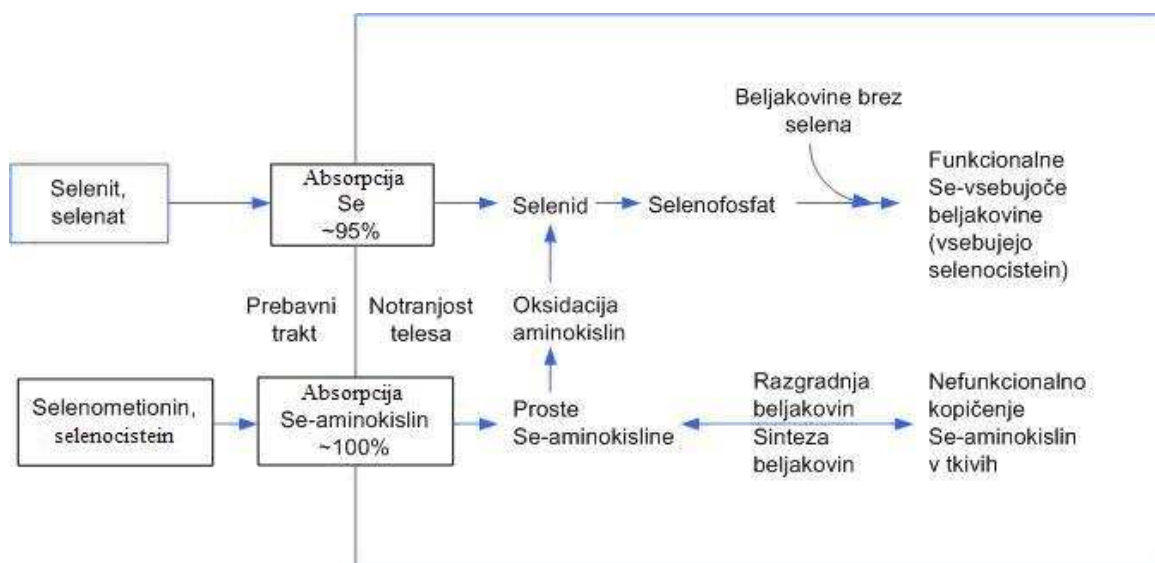
Preglednica I: Priporočene vrednosti za vnos Se za različne starostne skupine.

STAROST	VNOS Se (RDI, 2004) [19] µg/dan
Dojenčki	
0-4 meseci	5-15
4-12 mesecev	7-30
Otroci	
1-4 leta	10-40
4-7 let	15-45
7-10 let	20-50
10-13 let	25-60
13-15 let	25-60
Mladostniki in odrasli	
15-19 let	30-70
19-25 let	30-70
25-51 let	30-70
51-65 let	30-70
65 let in več	30-70
Noseče ženske	30-70

1.2.1.1 Absorpcija

V nasprotju z Mn, Zn, Fe in Cu, biološka kontrola presnove Se in I temelji predvsem na homeostatskem uravnavanju ledvičnega izločanja, medtem ko je njihova absorpcija le

delno uravnavana [20]. Več kot 90% selenometionina, glavno obliko elementa v hrani, se absorbira po enakem mehanizmu kot metionin (slika 1). Anorganska oblika selena, selenat (SeO_4^{2-}), se absorbira skoraj sto odstotno, vendar se ga kasneje velik del izloči v urin, še preden se lahko vgradi v tkiva. Druga anorganska oblika selena, selenit (SeO_3^{2-}), ima zaradi interakcij z ostalimi spojinami v črevesu bolj variabilno absorpcijo in se po absorpciji v organizmu bolj zadržuje, kot selenat. Absorpcija selenita je večja kot 50% [21]. Selenit in selenat se pogosto uporabljata kot dopolnilo k prehrani.



Slika 1: Presnovna pot anorganskega selena in selen vsebujočih aminokislin [20].

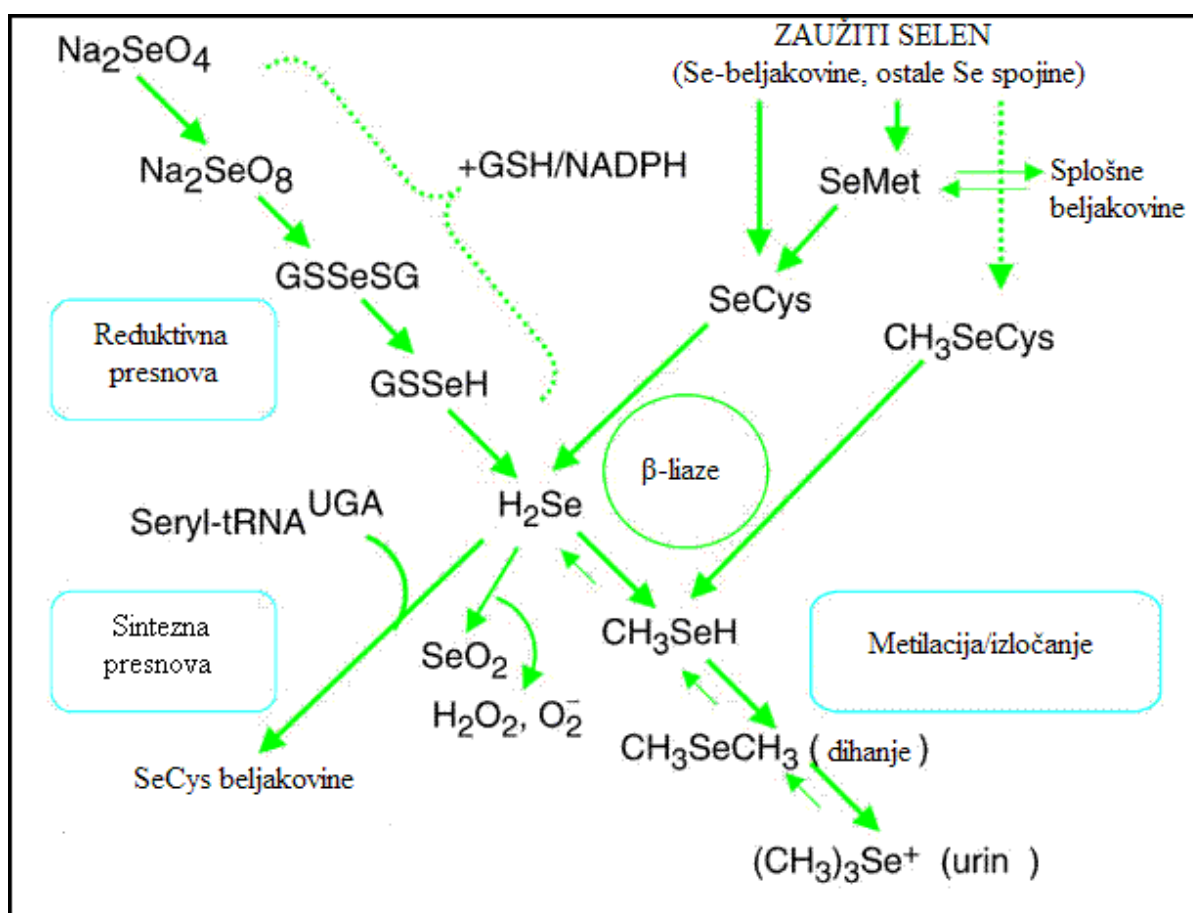
1.2.1.2 Skladiščenje selena v telesu

Selen je v človeškem organizmu vskladiščen v dveh oblikah. Prva oblika skladiščenja selena je selenometionin. Njegova zaloga je odvisna od dnevnega vnosa selena v obliki selenometionina. V tej obliki skladiščenja selena je njegova dostopnost funkcija preobrata metioninskega rezervoarja in ne potreb organizma po selenu [21].

Drugo obliko zaloge selena predstavlja glutation peroksidaza (GSH-Px-1) v jetrih. V primeru, da dnevni vnos selena ne zadosti potrebam sinteze selenoproteinov, se zniža koncentracija GSH-Px-1 obveščevalne ribonukleinske kisline (mRNA). S tem se zagotavlja selen za sintezo ostalih selenoproteinov [21].

1.2.1.3 Presnova

Ko selenometionin vstopi v organizem igra vlogo metionina vse dokler ne vstopi v specifično presnovno pot, v kateri se pretvori v selenocistein. Produkt te presnovne poti je prosti selenocistein, ki se nadalje razgradi in sprosti reducirano obliko elementa, označenega kot selenid (H_2Se). Zaužiti selenit, selenat in selenocistein se vsi pretvorijo v selenid (glej sliki 1 in 2). Selenid se lahko naprej pretvori v selenofosfat, to je prekursor selenocisteina v selenoproteinih, in selen v prenašalni RNA (tRNA), lahko pa se pretvori v izločevalne presnovke, ki so vsi v obliki metilirane seleno [21].



Slika 2: Presnova seleno v organizmu (prirejeno po [22]).

1.2.1.4 Izločanje

Največ seleno se izloči z urinom in le v manjši meri preko blata, potu in izdihanega zraka. Pri tem pa je količina izločenega seleno preko urina sorazmerna količini zaužitega elementa. Pri posameznikih, ki so akutno zaužili veliko količino seleno, lahko zaznamo

zadah po česnu. Vonj po česnu je znak prisotnosti dimetilselenida v izdihanem zraku [23]. V neki raziskavi, v kateri so sodelovali zdravi prostovoljci zahodne Nemčije so ugotovili, da izločanje selena pozitivno korelira z izločanjem sečnine, kar po vsej verjetnosti kaže, da se največji del selena vnese z beljakovinsko bogato hrano [24]. Ugotovili so, da izločanje selena direktno korelira z izločanjem kreatinina. To pomeni, da mišice, ki vsebujejo blizu 50% vsega selena v organizmu, vplivajo na izločanje selena v urin. Drugi dokaz, da mišice vplivajo na izločanje selena v urin je, da se po končani intenzivni mišični aktivnosti (tek) ojača izločanje selena. Dnevno izločanje selena je odvisno od stopnje glomerulne filtracije (GFR) ledvic, ki jo ugotavljamo z očistkom (klirensom) kreatinina. To je pomembno, saj če uporabljamo stopnjo izločanja selena za parameter statusa selena v organizmu, mora biti funkcija ledvic poznana [24]. Izločanje selena preko urina lahko koeksistira z izgubljanjem proteinov preko urina.

1.2.2 Toksičnost selena - selenoza

Kronična selenoza je zelo redka [60]. Največji povprečni dnevni vnos selena, ki pri odraslem človeku še ne povzroči selenoze je ocenjen na 750 µg [58], sicer pa različni avtorji navajajo različne podatke o maksimalnem dnevnem vnosu selena, ki še ne povzroča selenoze. Tkiva, ki so pri selenozi najbolj prizadeta so lasje, prsti na rokah in nogah, nohti, koža, zobje in živčni sistem. Glavni simptomi letalne zastrupitve so nekrotična degeneracija jeter, fibroza ledvic in miokardna kongestija [59].

1.2.3 Selenobeljakovine v organizmu

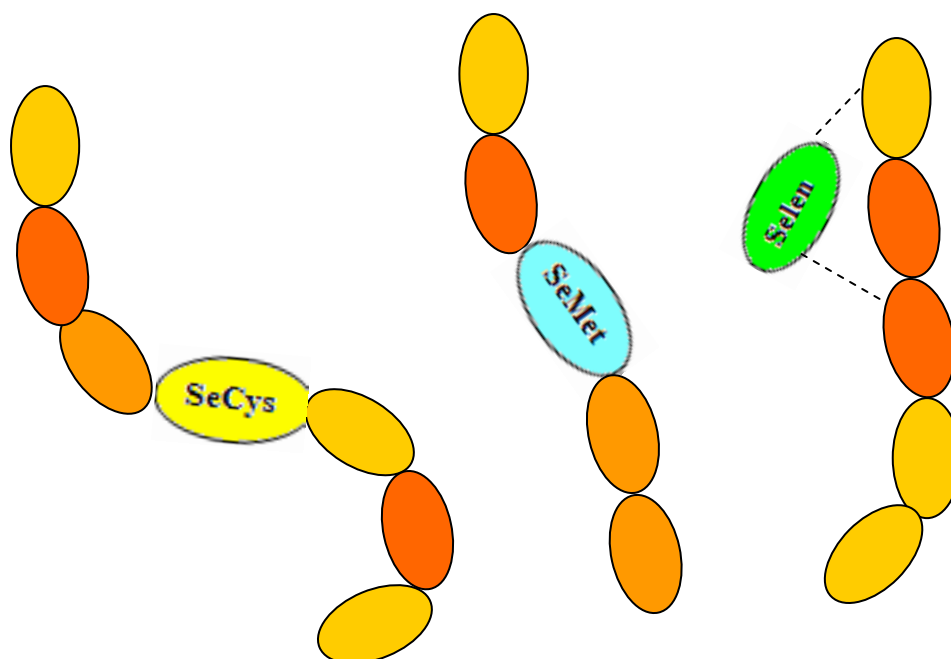
Identificiranih je 30 selenobeljakovin, od teh pa jih ima 15 poznano biološko vlogo. Selen je vgrajen kot selenocistein v aktivnem mestu mnogih selenobeljakovin. Prve okarakterizirane selenobeljakovine so bile štiri glutation peroksidaze: klasična GSH-Px-1, gastrointestinalna GSH-Px-2, plazemska GSH-Px-3 in fosfolipid hidroperoksid GSH-Px-4. Tioredoksin reduktaza (TR) je pred kratkim identificiran selenocistein vsebujoč encim, ki katalizira od NADPH odvisno redukcijo tioredoksina. TR ima zato regulatorno vlogo v presnovni aktivnosti tioredoksina. Pomembne selenobeljakovine so še jodtironin reduktaza, encim selenofosfat sintetaza, selenoprotein P, selenoprotein W, mitohondrialni kapsularni selenoprotein, prostatični epiteliarni selenoprotein in drugi. Selen je v beljakovinah

prisoten v obliki SeCys ali SeMet aminokislinskih preostankov (slika 3). Eksogeni SeMet je lahko vgrajen v beljakovino v nespremenjeni obliki, pri tem pa vgradnjo te aminokislina kodira Met kodon. Torej ni razločevanja med Met in SeMet.

A: selenobeljakovina

B: Se-vsebujoča beljakovina

C: nespecifično vezan selen



Slika 3: Vrste beljakovin, ki vsebujejo selen (prirejeno po [15]).

V nasprotju s SeMet, pa je vgradnja SeCys specifična. Eksogeni SeCys se ne more vgraditi v beljakovine v intaktni obliki, ker se mora prej pretvoriti v H_2Se in preko njega v selenofosfat. Slednji intermediat predstavlja aktivirano obliko Se, ki služi skupaj z aktiviranim serinskim preostankom (Ser) za endogeno sintezo SeCys preostanka. Kodon za vgradnjo SeCys preostanka v beljakovino je UGA, ki je sicer stop kodon.

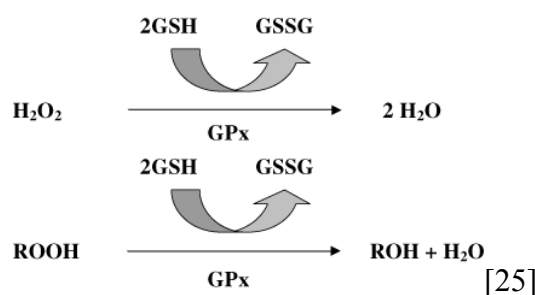
Beljakovine, ki imajo vgrajen selen v obliki SeCys preostanka se imenujejo selenobeljakovine (slika 3-A). Beljakovine, ki vsebujejo selen v obliki SeMet, pa so selen-vsebujoče beljakovine (slika 3-B). Selen je torej v beljakovinah prisoten kot direktni produkt v obliki SeCys in/ali SeMet preostanka in je popolnoma drugačen od ostalih metaloidov oz. kovin, ki so vezane na beljakovine s koordinacijskimi vezmi na funkcionalne skupine beljakovin (kompleksi kovina-beljakovina), kot je prikazano na sliki 3-C [15].

1.2.4 Vloga selenobeljakovin v organizmu

■ Glutation peroksidaza (GSH-Px)

Je splošno ime za družino encimov s peroksidazno aktivnostjo, katerih glavna vloga je zaščita organizma pred oksidativno poškodbo. Biološka funkcija glutacione peroksidaze je redukcija lipidnih peroksidov in redukcija prostega vodikovega peroksida v vodo. Obstaja več izoencimov, ki imajo različno substratno specifičnost. Najbolj pogost izoencim je glutacione peroksidaza 1, katere glavni substrat je vodikov peroksid.

Celokupna reakcija:



GSH-Px vsebujejo selenocisteinski ostanek v aktivnem delu encima v vsaki izmed štirih podenot.

■ Selenoprotein P (Sel P)

Selenoprotein P je zunajcelični glikoprotein, ki vsebuje veliko selenocisteina. Ima dve domeni z različno vsebnostjo selena [26]. Plazemski Sel P, ki je glavna oblika Se v plazmi, je prisoten v najmanj dveh izooblikah, ki imata v večjem delu identično zaporedje aminokislin. Izoobliki nista antigensko različni, prepoznavni sta preko istih protiteles. Razlikujeta se po različni molekularni masi. Daljša oblika ima molekularno maso 57 kDa, krajša pa 45 kDa [16].

Funkcije Sel P:

- Visoko selektivna peroksidazna aktivnost [26]
- Transportni protein za Se (transport iz jeter do perifernih tkiv) [16]
- Sodeluje pri detoksifikaciji Hg, Cd in Ag. Selenid in kovinski ioni oblikujejo kompleks, $(\text{Hg}/\text{Cd}/\text{Ag}-\text{Se})_n$, ki se potem selektivno veže na vezavna mesta (m) na selenoproteinu P in oblikuje $\{(\text{Hg}/\text{Cd}/\text{Ag}-\text{Se})_n\}_m$ -selenoprotein P kompleks [26].

■ **Selenofosfat sintetaza**

Selenofosfat sintetaza katalizira reakcijo v kateri reagirata ATP in selenid in tvorita H_3SePO_3 , H_3PO_4 , in AMP v razmerju 1:1:1. Selenofosfat (H_3SePO_3) je donor Se pri biosintezi SeCys [16, 27].

■ **Jodtironin dejodinaze**

Znani so trije encimi (D1, D2 in D3), vsi so selenocistein vsebujoči encimi, ki skrbijo za pravilno količino aktivne oblike ščitničnega hormona trijodtironina. D1 katalizira pretvorbo tiroksina (T4) v aktivno obliko trijodtironina (T3), prav tako pa je D1 zmožen deaktivacije T3 z redukcijo v T2. D2 aktivira T4 v T3, medtem ko je D3 primarni inaktivator T4 in T3 [28].

■ **Tioredoksin reduktaze**

Tioredoksin reduktaze so družina selen-vsebujočih, piridin nukleotid-disulfid oksidoreduktaz [29]. Katalizirajo od NADPH-odvisno redukcijo tioredoksina in drugih endogenih in eksogenih spojin. Tioredoksin reduktaze imajo vlogo v celični rasti in transformaciji, recikliranju askorbata iz njegove oksidirane oblike in pri obrambi organizma pred oksidativno poškodbo.

1.3 NEESENCIALNI OLIGOELEMENTI

Neesencialni oligoelementi (NOE) so prisotni v organizmih, a njihova bistvena biokemijska funkcija (še) ni dokazana. V zvezi z njimi so znane predvsem zastrupitve. Ti elementi so težke kovine: svinec (Pb), kadmij (Cd) in živo srebro (Hg), ter ostali elementi: aluminij (Al), arzen (As), bor (B), vanadij (Va) in nikelj (Ni).

1.3.1 Težke kovine

Pb, Cd in Hg so elementi, ki spadajo med težke kovine in so stabilni, obstojni in trajni onesnaževalci okolja [30]. V okolje se sproščajo predvsem z različnimi industrijskimi aktivnostmi in se v okolju nalagajo ter so podvrženi bioakumulaciji v prehranjevalni verigi [31].

Živo srebro

Živo srebro (Hg) je edina kovina, ki je pri običajnih temperaturah v tekočem agregatnem stanju. Je težka, srebrno bela kovina. Njegove zlitine se imenujejo amalgami. Najpogostejše Hg-soli so: živosrebrov klorid (HgCl_2), kalomel (Hg_2Cl_2), živosrebrov fulminat ($\text{Hg}(\text{ONC})_2$ -detonator v eksplozivih) in živosrebrov sulfid (HgS) [32]. Iz *in vitro* in *in vivo* študij je znano, da Hg pospešuje lipidno peroksidacijo preko pospešenega tvorjenja prostih radikalov, interakcij z antioksidativnimi encimi in z redukcijo biorazpoložljivega selena [33]. Toksični učinki živega srebra so dobro poznani. V neki slovenski študiji so raziskovali vpliv dolgoročne pretekle izpostavljenosti elementarnemu Hg na antioksidativno kapaciteto in lipidno peroksidacijo pri rudarjih Hg [33]. Na podlagi rezultatov so zaključili, da povečana katalazna aktivnost v eritrocitih in zvišane koncentracije melatonina v krvi - ki naj bi bila indirektni pokazatelj aktivnosti prostih radikalov, relativno znižana koncentracija P-Se in zvišano izločanje melatonina v urin, kažejo na zmerno povečanje sproščanja prostih radikalov in lipidno peroksidacijo pri rudarjih živega srebra. Omenjena študija tudi potrjuje hipoteze nekaterih študij, da je Hg eden od faktorjev tveganja za kardiovaskularne bolezni. V primeru poklicne izpostavljenosti Hg^0 se najpogosteje pojavijo naslednji simptomi in znaki: eritrimem, povečana razdražljivost, depresija, nespečnost, psihotični napadi, tremor in ledvična okvara [34, 35]. V možganih, endokrinih žlezah in tudi v češeriki, ledvicah ter drugih tkivih bivših rudarjev iz Idrijskega rudnika živega srebra so po nekaj letih po njihovi izpostavitvi [36, 37] zaznali povečano zadrževanje in so-akumulacijo (molarno razmerje blizu 1:1) Hg in Se. V neki *in vivo* študiji na miših [38], se je pokazala antioksidativna vloga hormona češerike, melatonina, katerega sintezo moti visoka akumulacija Hg pri upokojenih rudarjih [37]. Po nekaterih študijah naj bi bila biološka razpolovna doba živega srebra, akumuliranega v možganih, en mesec, po nekaterih drugih pa je razpolovni čas anorganskega Hg daljši. Oblika Hg, ki je odgovorna za tako dolgo razpolovno dobo Hg naj bi bil kompleks Hg-selenid, za katerega kaže da je biokemijsko neaktiven [35]. Na akumulacijo anorganskega Hg v tkivih in njegovo izločanje iz tkivnih celic vplivajo tudi interakcije med Hg in metalotioneinom in nizkomolekularnimi tioli. Izpostavljenost anorganskemu Hg se pojavlja v dveh oblikah: Hg-soli in elementni Hg^0 ali Hg-para (hlapi). Za Hg-soli so v sesalcih kritični organ ledvica, za Hg-para pa so kritični organ možgani. V obeh tipih izpostavitve pa je glavna pot izločanja Hg preko blata in urina, ki je odvisna od odmerka. Le manjša frakcija Hg se izloči preko dihanja [39]. Metil živo srebro (MeHg) je najbolj toksična oblika Hg. MeHg se bioakumulira v vodnih prehranskih verigah, saj je

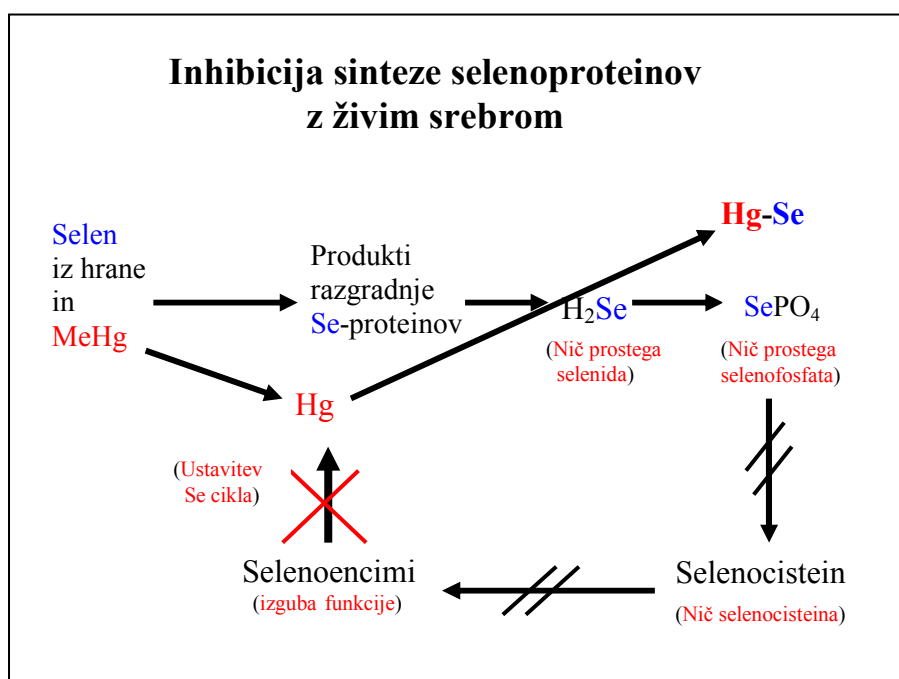
topen v maščobah in se veže z -SH skupinami proteinov. Zato so povišane koncentracije Hg prisotne zlasti pri ribah na višjem trofičnem nivoju, kot sta morski pes in tuna [40].

Interakcije med Se in Hg so znane že več kot 30 let. Se je na splošno kazal zaščitno vlogo pred toksičnostjo Hg, medtem ko je paradoksalno zviševal tkivno koncentracijo Hg [26]. Kaže se zveza med Se in Hg v urinu ($r=0,625$; $p<0.001$), vendar ne v serumu [41].

Selen se veže na Hg, tako se onemogočijo toksični učinki Hg, a s tem je manj Se prostega za ostale funkcije selena (glej sliko 7) [42]:



Pri tem je afiniteta vezave $\sim 10^{45}$, topnost kompleksa pa zelo nizka $\sim 10^{-58}$ - 10^{-65} .



Slika 7: Prikaz inhibicijskega delovanja Hg na sintezo selenoproteinov (prirejeno po[42]).

Nastali kompleks (Hg-Se) se kasneje specifično veže na selenoprotein P (Sel P) v krvi. Nastane $\{(Hg-Se)_n\}_m$ -Sel P kompleks. Specifična vezava Hg-Se kompleksa, in ne Hg^{2+} ali selenida, na Sel P se razlaga z obstojem edinstvenih vezavnih mest s kationskimi in anionskimi skupinami, kot so imidazolne in selenolne skupine na Sel P. Število n v kompleksu $(Hg-Se)_n$ je ocenjeno na okoli 100, število m v $\{(Hg-Se)_n\}_m$ -Sel P kompleksu pa 35 [43]. Hg ima sposobnost prehajanja posteljčine in krvno-možganske pregrade in s tem tudi sposobnost zmanjšanja aktivnosti selenoproteinov.

Svinec

Svinec (Pb) je modrikasto-bela lesketajoča kovina. Je zelo mehak, koven, raztezen in relativno slab prevodnik elektrike. Pb je zelo odporen na korozijo, vendar na zraku izgubi sijaj [44]. Svinec je dobro poznan nevrotoksin, akumulira se v kosteh in se iz njih mobilizira med nosečnostjo in laktacijo ter tako povzroča izpostavitve ploda in dojenčkov svincu, pri tem pa je pomembna izpostavitve matere svincu do nosečnosti [45]. Glavni vir izpostavitve svincu je s Pb kontaminirana hrana in pitna voda [46]. Na mnogih območjih so v zadnjih desetletjih opazili znižanje krvne koncentracije Pb (K-Pb), v glavnem zaradi prenehanja uporabe osvinčenega bencina, pa tudi zaradi zmanjšanja ostalih virov izpostavitve svincu. V Evropi se je v letih od 1900 do 2003 koncentracija Pb v zraku znižala za 50-70%. Koncentracija svinca v zemlji se običajno giblje od pod 10 mg/kg do >70 mg/kg zemlje, povprečno pa 22,6 mg/kg [45]. Absorpcija vdihanega anorganskega Pb je ~95%, gastrointestinalna (GIT) absorpcija pa je odvisna od fiziološkega stanja izpostavljenega človeka in od vrste Pb-spojine. GIT absorpcija Pb je večja pri otrocih (40-50%), kot pri odraslih (3-10%). 94% celotne količine Pb v odraslem človeku je shranjene v kosteh in zobeh (pri otrocih 73%). Eliminacijski razpolovni čas anorganskega Pb je približno 30 dni v krvi in 27 let v kosteh [46].

Kadmij

Kadmij (Cd) je lesketajoča, srebrno bela, kovna in raztegljiva kovina. Je tako mehak, da ga lahko režemo z nožem [47]. Glavni način izpostavitve človeka kadmiju je cigaretni dim. Koncentracija Cd v zraku je sicer nizka, v rangi ng/m³. Koncentracije Cd, večje od 40 ng/m³, se pojavljajo na urbanih področjih, kjer je velika stopnja onesnaženja zraka z izgorevanjem fosilnih goriv. Kadilci zaužijejo dvakratni dnevni vnos Cd nekadilcev, saj ena cigareta vsebuje 1-2 µg Cd, od inhaliranega Cd pa ga 40-60% vstopi v organizem [48]. Prav tako so lahko delavci v industrijah, kjer se predelujejo kadmijeve snovi, izpostavljeni prekomernim koncentracijam Cd v zraku. Ko Cd vstopi v organizem se najprej po krvi prenese v jetra, v katerih se veže na proteine, nastali kompleksi pa se prenesejo v ledvica. Kadmij se v ledvicah akumulira in poškoduje sistem filtriranja, to je vzrok za izločanje esencialnih proteinov in sladkorjev iz ledvic. Čas izločanja akumuliranega Cd iz ledvic je zelo dolg. Ostali škodljivi učinki kadmija so: diareja, bolečine v želodcu in intenzivno bruhanje, hitrejši zlomi kosti, poškodbe centralnega živčnega sistema in imunskega sistema ter psihološke bolezni. Cd je dokazano kancerogen [47].

1.3.2 Arzen (As) in aluminij (Al)

Arzen se v naravi pojavlja v treh alotropskih oblikah: rumeni, črni in sivi; stabilna oblika pa je srebrno-siva, ki je trda, kristalna in krhka. Z lahkoto se kombinira z večino elementov. Arzen najdemo povsod v naravi v nizkih koncentracijah. Pojavlja se v zemlji in mineralih, lahko vstopi v zrak v obliki prašnih delcev, ki jih lahko razpiha daleč na okrog. Viri arzena so še mikroorganizmi, delujoči vulkani, izgorevanje fosilnih goriv pa na leto v okolje sprostijo okoli 80 000 ton arzena. Ker je As v naravi zelo mobilna snov, je malo verjetno, da bi se ga večje koncentracije nahajale na specifičnem mestu [49]. Arzen je eden od najbolj toksičnih elementov. Ljudje smo mu izpostavljeni preko hrane, vode in zraka. Možna je tudi izpostavitve preko kože s stikom kože z vodo ali zemljo, ki vsebuje As. Arzenu so bolj izpostavljeni ljudje, ki delajo z As ali živijo na kmetijskih področjih, na katerih so v preteklosti uporabljali As-vsebujoče pesticide. Koncentracija As v hrani je nizka, je pa lahko višja v morski hrani, saj se akumulira v ribah v katere se vnaša iz vode, ki je njihovo bivalno okolje. Izpostavitve anorganskemu arzenu lahko povzroči različne zdravstvene učinke, kot so draženje želodca, črevesa in pljuč, znižano proizvodnjo rdečih in belih krvnih celic ter spremembe na koži. Arzen je kancerogen, najpogosteje povzroča kožnega, pljučnega, jeternega in limfnega raka. Zelo visoka izpostavljenost arzenu lahko povzroči neplodnost in splave pri ženskah, zniža odpornost na infekcije, lahko pa tudi poškoduje možgane. Letalna doza arzenovega (III) oksida (As_2O_3) je 100 mg.

Aluminij je kovina. Najdemo ga v večini živalskih in rastlinskih tkiv ter v naravnih vodah. Absorbira se preko gastrointestinalnega trakta v obliki aluminijevega hidroksida. Možen je parenteralen vnos pri cepljenju, dializi ali parenteralni prehrani. Vnos aluminija je lahko tudi transdermalni, npr. antiperspiranti. Laktat, citrat in askorbat lajšajo gastrointestinalno absorpcijo Al. V primeru, da vnos Al v organizem presega izločevalno kapaciteto organizma, se presežek Al akumulira v različnih tkivih: kosti, možgani, jetra, srce, vranica in mišice. Običajno se toksičnost Al pojavi pri bolnikih z oslABLJENO ledvično funkcijo. Akutna zastrupitev z aluminijem je zelo redka. Pri boleznih kosti, v povezavi z Al, prevladuje pomanjkljiva mineralizacija in osteomalacija. V možganih je aluminij povzročitelj oksidativnega stresa. Eliminacijski razpolovni čas aluminija v človeških možganih je 7 let, zato se Al v možganih akumulira, prav tako pa se akumulirajo tudi poškodbe. Aluminij ima direkten učinek na hematopoezo, povzroča mikrocitno anemijo. Za zdravljenje zastrupitev z aluminijem se uporabljajo kelatorji [50].

1.4 TEORIJA POSTAVITVE REFERENTNIH VREDNOSTI

Ker je učinek neke snovi odvisen od odmerka, velja staro Paracelsusovo pravilo, da je prav vsaka snov lahko strup. To pravilo velja tudi za esencialne oligoelemente, zato je pomembno poznati njihove referentne vrednosti vnosa.

Terminologija

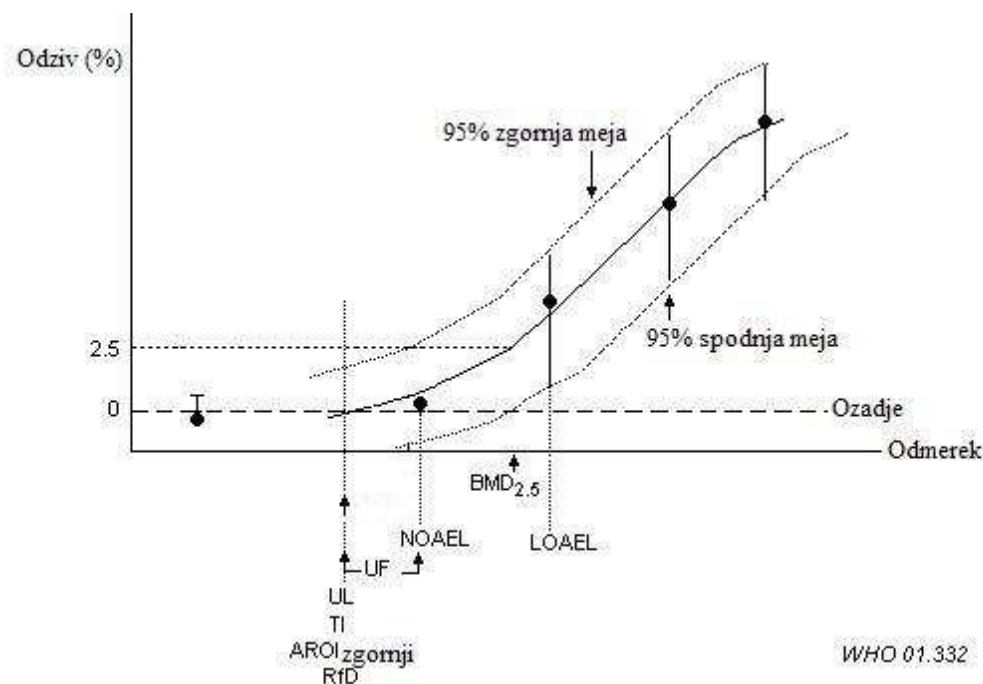
- **Populacija:** izraz se nanaša na skupino, ki je homogena v smislu starosti, spola in značilnosti, za katere se domneva, da vplivajo na potrebe [51].
- **Faktorska ocena potreb po določenem hranilu:** je startna točka v definiranju potreb po določenem hranilu. »Faktorski model« temelji na minimalnih potrebah po določenem hranilu za nadomestitev njegovih izgub preko izločanja in koriščenja pri nizkem vnosu, ne da bi se telesne zaloge tega elementa znižale in običajno zadostujejo za preprečevanje kliničnih pomankljivosti pri odraslih [51]. Faktorske metode se uporabljajo samo kot začetna ocena pri določanju posameznikovih potreb ali kadar funkcijski, klinični ali biokemični kriteriji primernosti niso določeni.
- **Potrebe posameznika:** po WHO [51] je potreba posameznika po določenem hranilu najnižja kontinuirana količina zaužitega hranila, ki pri določeni stopnji izkoristka hranila, ohranja definirano količino hranila v posamezniku. Poznamo bazalne in normativne potrebe. **Bazalna potreba** je potrebna količina vnosa hranila, ki preprečuje patološko pomembne in klinično zaznavne znake nepravilne funkcije, pripisane pomanjkanju hranila. **Normativna potreba** se nanaša na količino vnosa, ki služi za vzdrževanje tkivnih zalog ali rezerv, za katere se domneva, da so potrebne. Razlika med vnosom, ki ustreza bazalnim potrebam in vnosom, ki ustreza normativnim potrebam, predstavlja zaščitni pufer, ki ga predstavljajo systemske zaloge in homeostatske prilagoditve, kadar je vnos hranila prenizek [52]. Pod nivojem bazalnih potreb obstaja večja verjetnost, da bo homeostatska prilagoditev nezadostna, kar lahko pripelje do presnovnih in drugih nepravilnosti.
- **RDI-Recommended Daily Intake:** priporočljiv dnevni vnos, je statistično ocenjen vnos hranila, ki zagotovi potrebe večine (97,5%) populacije po določenem hranilu. Definiran je kot povprečni potrebni dnevni vnos hranila plus 2 standardna odklona (SD). Za posameznika torej obstaja zelo majhna verjetnost, da RDI ne bi zadostil njegovim potrebam po tem hranilu.

Toksikološki izrazi

- Sprejemljiv dnevni vnos (ADI-acceptable daily intake) in
- Toleriran dnevni vnos (TDI-tolerable daily intake): sta oceni količine snovi, ki jo lahko dnevno zaužijemo, skozi celotno življensko obdobje, brez upoštevanja vrednega tveganja. Pri tem se ADI nanaša na dodatke k prehrani, TDI pa se nanaša na kontaminante [52].

1.4.1 Pristopi za določanje mejnih odmerkov

Podatki, ki se uporabljajo za določitev TDI so redko popolnoma določeni in dokončni, zato morajo biti narejene uravnalne prilagoditve. En pristop uporablja faktorje negotovosti (UFs-uncertainty factors), ki upoštevajo znanstvene negotovosti in variabilnost ter tako zmanjšajo eksperimentalno ali klinično določene toksikološke mejne vrednosti (NOAEL-no observed adverse effect level, LOAEL-lowest observed adverse effect level). Alternativna metoda, imenovana pristop označitve odmerka (benchmark dose approach), analizira krivuljo funkcije *odmerek-odziv*. Metoda vključuje zaupanje okoli centralne ocene (krivulje) in zato predstavlja natančnejšo oceno, ki temelji na dostopnih podatkih (slika 8) [52].



Slika 8: Teoretična predstavitev spodnjega dela krivulje, ki prikazuje učinek= $f(\text{odmerek})$.

Slika 8 je teoretični prikaz spodnjega dela krivulje *odmerek-učinek*. BMD_{2,5} (benchmark dose) je odmerek, pri katerem 2,5% posameznikov doživi negativen učinek. NOAEL (no observed adverse effect level) je odmerek, ki ne povzroči negativnega učinka. UF je faktor negotovosti.

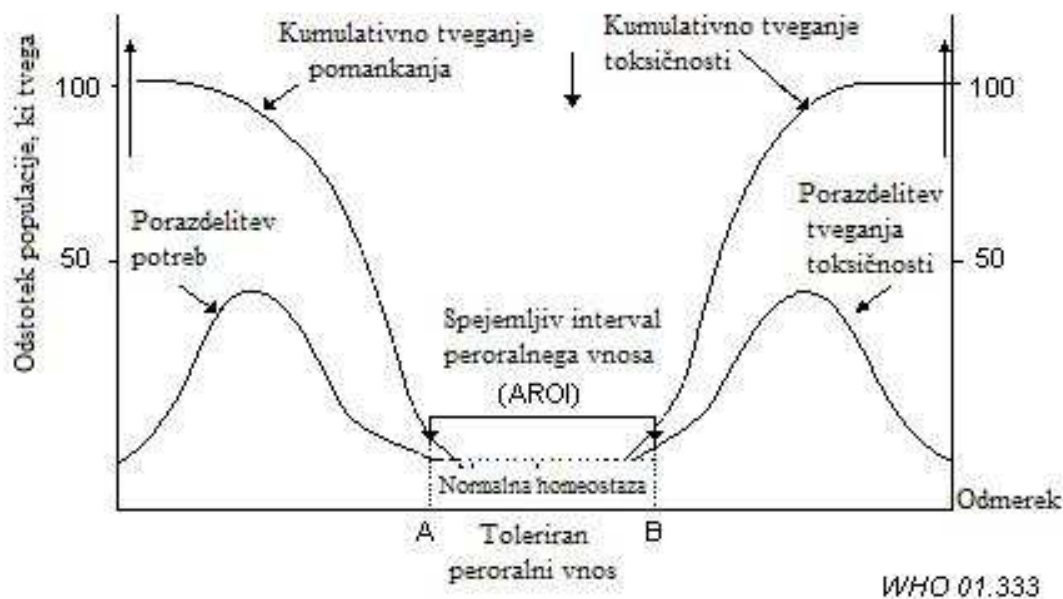
Faktorji negotovosti (UF) se uporabljajo pri določanju odmerka brez negativnega učinka (NOAEL) ali najnižjem odmerku z negativnim učinkom (LOAEL) za določitev ADI, TDI. Faktorji negotovosti oz. varnosti so določeni na osnovi primernosti in kvalitete dostopnih podatkov. Pri določanju UF-jev upoštevamo posamezne faktorje, ki vplivajo na negotovost. Ti faktorji predstavljajo primernost osrednje študije, medvrstno ekstrapolacijo, razlike v občutljivosti posameznikov v človeški populaciji, naravo toksičnosti in primernost vseh zbranih podatkov, pri upoštevanju visoko proti nizko doznim ekstrapolacijam in ekstrapolacij iz kratkoročnih proti kroničnim učinkom [53]. Določi se produkt posameznih faktorjev in se ga uporabi za izračun ADI in TDI iz NOAEL ali LOAEL:

$$TDI = \frac{\text{NOAEL ali LOAEL}}{\text{Produkt UF-jev}}$$

Izbira ustreznega UF je zelo pomembna pri določanju TDI za esencialne oligoelemente. Uporaba prevelikega UF lahko poveča tveganje za pomankanje esencialnega oligoelementa. Zato je pri izbiri ustreznega UF za esencialne oligoelemente potrebno upoštevati potencialne učinke, tako pomankanja, kot tudi toksičnosti elementa.

1.4.2 Sprejemljiv interval peroralnega vnosa za esencialne oligoelemente

Sprejemljiv interval peroralnega vnosa (AROI-acceptable range of oral intake): je pri esencialnih oligoelementih prikazan z U-krivuljo *odmerek-odziv*, ki se razteza od esencialnih odmerkov oligoelementa do odmerkov, ki povzročajo toksične učinke (slika 9).



Slika 9: Odstotek populacije, ki tvega pomankanje in odstotek populacije, ki tvega toksičnost, glede na peroralni vnos (prirejeno po [52]).

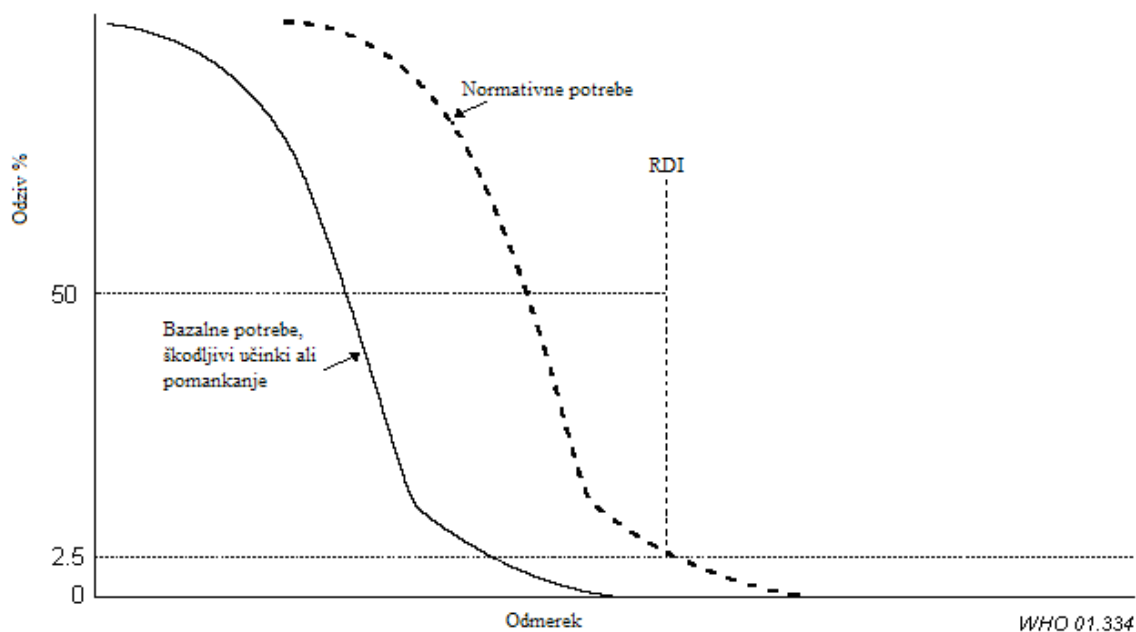
Če vnos esencialnega oligoelementa pade pod A (spodnja meja AROI, kjer bo 2,5% populacije tvegalo pomankanje), bo večji delež populacije tvegalo pomankanje. Če vnos esencialnega oligoelementa preseže B (kjer 2,5% populacije tvega toksičnost), bo progresivno večji delež populacije tvegala toksične učinke oligoelementa (glej sliko 9) [52]. Zavedati se je potrebno, da niti zgornja, niti spodnja meja AROI ni absolutna vrednost, pod ali nad katero se bodo pojavili škodljivi učinki.

Zgornja meja AROI

Slika 8 prikazuje teoretično analizo pristopa označitve odmerka (teoretical benchmark analysis), na krivulji *odmerek-odziv*, za pojasnitev izpeljave mej. Za izpeljavo teh točk moramo upoštevati celoten set podatkov, na katerem temelji krivulja *odmerek-odziv*.

Spodnja meja AROI

Slika 10 opisuje krivulji *odmerek-učinek* za nastanek učinkov pomankanja, ko ni zadoščeno bazalnim potrebam. Kot spodnja meja sprejemljivega peroralnega vnosa (AROI) se običajno uporablja krivulja normativnih potreb plus 2 standardna odklona (SD).

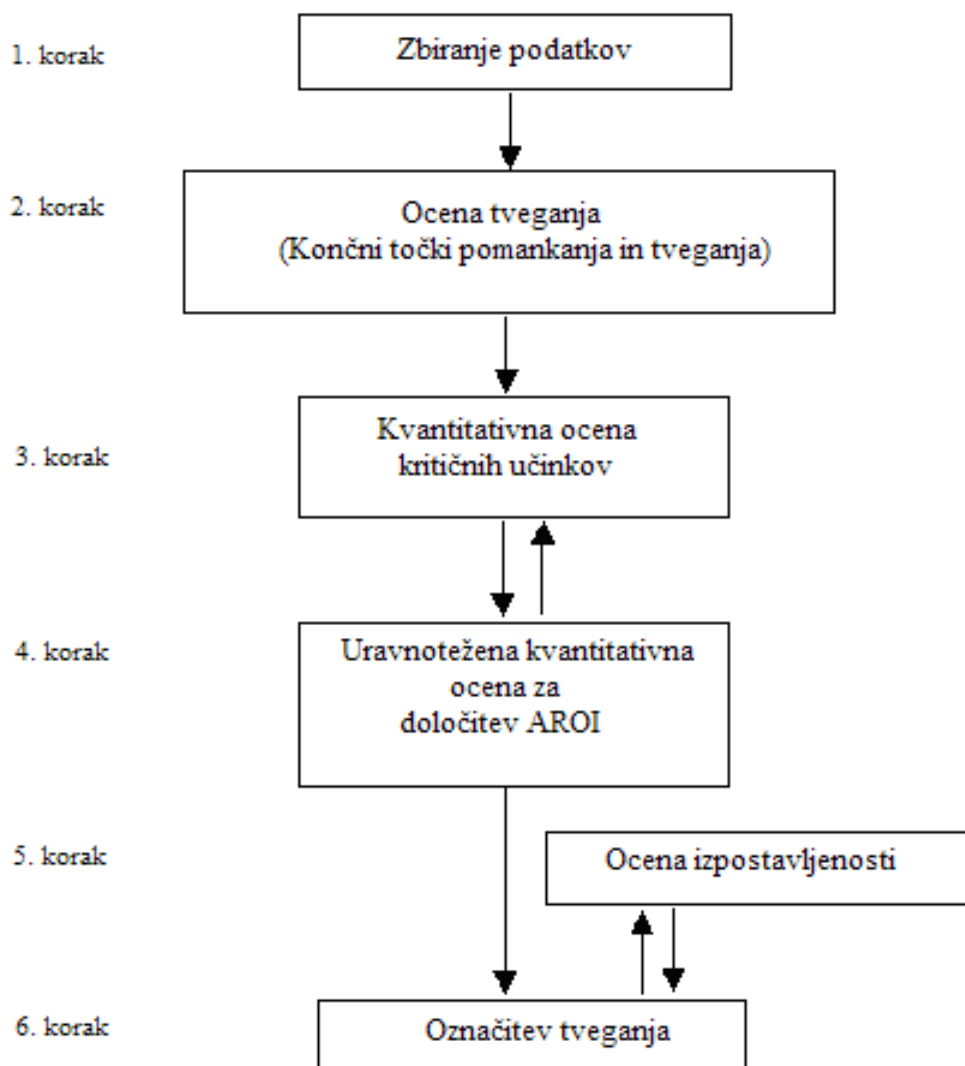


Slika 10: Krivulji odmerek-učinek za nastanek učinkov pomanjkanja, ko ni zadoščeno bazalnim potrebam organizma po esencialnem oligoelementu (prirejeno po [52]).

1.4.3 Uporaba načel za oceno tveganja s strani esencialnih oligoelementov

Slika 11 prikazuje korake, ki jim moramo slediti pri ocenjevanju tveganja zdravja preko izpostavitve esencialnim oligoelementom. V vseh korakih je potrebno upoštevati nezanesljivost in variabilnost podatkov in populacije [52].

1. **korak:** je zbiranje relevantnih podatkov o esencialnih oligoelementih in ocena njihove primernosti. Namen je postaviti bazo podatkov za nadaljne analize. Kadar ni podatkov o funkcionalnih učinkih na ljudeh se lahko poslužujemo podatkov o učinkih na živalih.
2. **korak:** pretehtamo zbrane dokaze, da identificiramo klinično in toksikološko relevantne končne točke za pomankljivo in prekomerno izpostavljenost esencialnemu oligoelementu. Pri tem upoštevamo naslednje faktorje: vrsta spojine, homeostatski mehanizem, biorazpoložljivost, narava izpostavljenosti, variabilnost populacije in variabilnost med spoloma. Za uspešno izvedbo tega koraka morajo sodelovati eksperti iz vseh primernih znanstvenih disciplin.



Slika 11: Koraki, ki jim moramo slediti pri oceni tveganja s strani esencialnih oligoelementov (prirejeno po [52]).

3. korak: opisati in oceniti moramo različne krivulje *odmerek-odziv* za vsako končno točko pomanjkljive in prekomerne izpostavljenosti za različne populacije. Vrednosti vnosov/izpostavitvev, ki označujejo kritične učinke, lahko določimo na podlagi podatkov bolnikov in eksperimentalnih, epidemioloških, kliničnih ali presnovnih študij, tako nutricionistov kot toksikologov.
4. korak: AROI določimo po principu tehtanja učinkov, videnih po pomanjkljivi in prekomerni izpostavljenosti elementu v zdravih populacijah.

5. **korak:** pri oceni izpostavljenosti identificiramo in kvantificiramo vire izpostavitve (voda, hrana, dodatki, zemlja in prah), biorazpoložljivost in vzorce izpostavljenosti za subpopulacije določene populacije.
6. **korak:** pri označitvi tveganja povežemo v celoto zbrane informacije o izpostavljenosti in AROI.

1.5 METODE DOLOČANJA SELENA

Za oceno statusa Se se najpogosteje določa koncentracija selena v celokupni krvi in njenih frakcijah ter aktivnost GSH-Px. V zadnjem času je postala porazdelitev Se po plazemskih proteinih, zlasti SeP, pomemben pokazatelj statusa Se v organizmu. Za ločitev SeP od GSH-Px in albumina so zato razvili nekaj separacijskih tehnik, ki temeljijo na kromatografiji. Najpogosteje se uporablja afinitetna kromatografija, ki temelji na specifični vezavi SeP na heparin, vezan na sefarozo [54].

1.5.1 Detekcijske tehnike

Težave pri analizah človeških tekočin v največji meri izvirajo iz zelo nizke koncentracije elementov, ki je običajno nižja od sposobnosti detekcije rutinskih tehnik [55]. Za določitev celokupne koncentracije Se v plazmi in polni krvi se uporabljajo različne detekcijske tehnike: nevtronska aktivacijska analiza (NAA), molekularna fluorescenčna spektrometrija, masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS), atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES), atomska fluorescenčna spektrometrija s hidridno tehniko (HG-AFS), elektrotermična absorpcijska spektrometrija (ET-AAS), spektrofotometrične metode, fluorimetrija. Za določanje selena v proteinskih frakcijah po afinitetni kromatografiji, kjer so posamezne koncentracije Se zelo nizke, pa je nabor detekcijskih tehnik precej ozek. V teh primerih se poslužujemo metode ET-AAS ali HG-AFS [54].

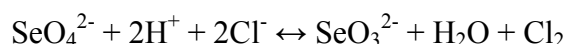
Hidridna tehnika

Hidridna tehnika loči elemente, ki tvorijo hlapne hidride, od osnove vzorca. Sestavljena je iz dveh procesov:

- sprostitvev hidrida iz raztopine vzorca (pretvorba analita v nakisanem vzorcu do hidrida in pretvorba v plinsko fazo),
- transport sproščenega hidrida s tokom nosilnega plina do atomizerja.

Z ločitvijo analita od osnove se izognemo interferencam, pri tem pa se izboljša meja zaznavnosti metode, poveča se natančnost in točnost metode. Večina reakcij med metaloidnimi oksianioni in natrijevim borohidridom (NaBH_4) in HCl tvori hlapljive hidride: H_2Te , H_2Se , H_3As , H_3Sb , itd. V primeru Se le seleniti (Se^{4+}) lahko tvorijo hidride, zato je pred prehodom vzorca v hidridni generator potrebno metaloid spraviti v ustrezno oksidacijsko stanje (Se^{6+}). Redukcija Se^{6+} (najpogostejša oblika Se po razkroju biološkega vzorca) največkrat poteče s pomočjo 50% HCl . Pomemben je čas (~10 min) med mešanjem reagentov in ločitvijo hlapnega hidrida od tekočine. Celoten proces v hidridnem generatorju je shematsko prikazan na sliki 12. Reagenti tečejo skupaj po sistemu cevi z vgrajeno peristaltično črpalko. Pri tem se reagenti med sabo dobro premešajo, reakcijski čas pa je določen z dolžino cevi, ki vodijo zmes v *ločevalec plin/tekočina*. V ločevalcu se hidrid in H_2 ločita od tekočega dela s pomočjo inertnega plina visoke čistote in se po plinski cevi vodita v optično celico. Večina uporabljenih reagentov, ki vstopijo v sistem, se izloči v odpadno posodo.

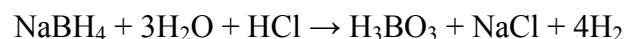
Reakcija redukcije Se (VI) v Se (IV):

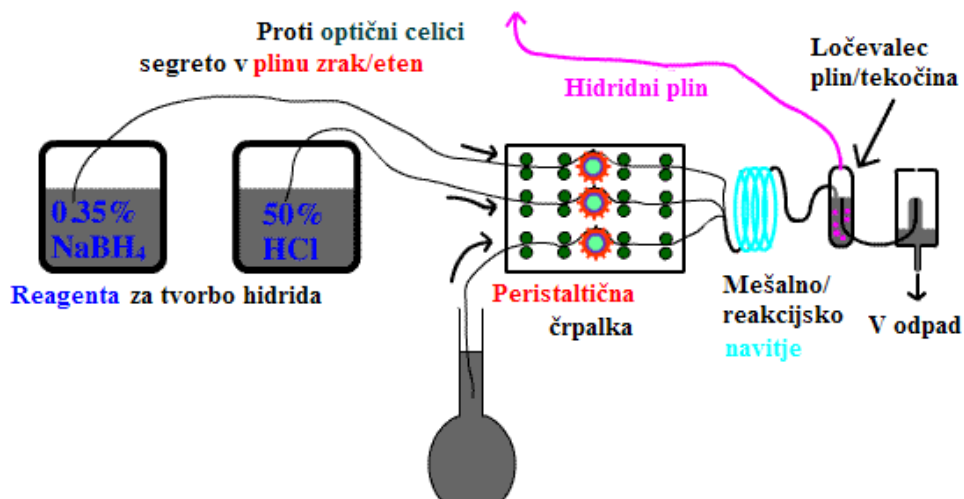


Reakcija nastanka hidrida:



Reakcija nastanka vodika:





Slika 12: Hidridni generator (prirejeno po [56]).

Pred vstopom plina v atomizator je potrebno odstraniti vlago, ker le-ta vpliva na občutljivost metode. Kot sušilni plin se najpogosteje uporablja zrak, dušik ali argon [16, 14, 56]. Hidridno tehniko lahko povežemo z različnimi detektorji, ki skupaj sestavljajo izboljšane tehnike, kot sta HG-AFS in HG-AAS. Zaradi odlične občutljivosti in selektivnosti je **atomska fluorescenčna spektrometrija** postala ena iz med najpomembnejših analitičnih orodij za analize oligoelementov. HG-AFS se z lahkoto kombinira s plinsko kromatografijo (GC) in HPLC za separacijo teh elementov iz različnih bioloških vzorcev [57]. Princip AFS je absorpcija svetlobe, ki jo atomi absorbirajo iz črtastega ali kontinuiranega izvora. Pri prehodu iz nastalega vzbujenega stanja nazaj v osnovno oddajajo fluorescenčno svetlobo. Merilo za koncentracijo analita v vzorcu je intenziteta emitirane svetlobe. Uporablja se tudi **atomska absorpcijska spektrometrija** (AAS), vendar v manjši meri saj ima nižjo občutljivost in ožje linearno območje določljivosti.

2 NAMEN DELA

Selen je esencialen oligoelement in ima kot sestavni del nekaterih biološko pomembnih proteinov pomembne funkcije v organizmu. Za vse pozitivne funkcije selena je ključnega pomena njegova optimalna prisotnost v organizmu. Tako previsok, kot tudi prenizek vnos selena v organizem zniža njegovo koristno biološko vlogo. Na vnos selena v organizem in njegovo biorazpoložljivost vpliva množica faktorjev.

V okviru EU projekta smo v Sloveniji v Ljubljani, Žužemberku in Idriji vzeli 151 vzorcev krvi in urina otrokom starim od 7-9 let. Pri njih smo določali tudi koncentracijo selena v plazmi. V diplomski nalogi bomo statistično ovrednotili rezultate meritev koncentracij selena v serumu z namenom, da ugotovimo:

- Ali se koncentracije selena v krvi razlikujejo glede na to, kje živimo?
- Ali so prebivalci v urbanem okolju obremenjeni s težkimi kovinami, kar bi pomenilo, da imajo tudi koncentracije Se v neravnotežju.
- Ali rudnik v Idriji vpliva na status Se pri prebivalcih tega predela in kako je s statusom Se prebivalcev v mestu?

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

Analizirali smo rezultate meritev koncentracije 151 vzorcev plazme otrok, starih od 7 do 9 let, ki smo jih razdelili v tri skupine, glede na to v kakšnem življenjskem okolju živijo. Rezultate meritev koncentracije selena v plazmi otrok iz osnovne šole Žužemberk smo uvrstili v skupino otrok, živečih v kmečkem okolju. Rezultate otrok iz Idrije smo uvrstili v skupino iz obremenjenega okolja, rezultate otrok iz osnovne šole Vižmarje Brod pa v skupino meščanov. Znotraj treh skupin smo razdelili otroke po spolu.

3.2 STATISTIČNI PROGRAM

Za statistično obdelavo zbranih podatkov smo uporabili statistični programski paket SPSS 15.0 za Windows. Za preverjanje hipoteze o normalni porazdelitvi vrednosti koncentracij selena v plazmi smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Homogenost varianc smo preverili z Levenejevo statistiko. Testiranje razlik med aritmetičnimi sredinami vrednosti koncentracij Se v plazmi med tremi skupinami otrok smo opravili s testom One-way ANOVA.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 ZBIRANJE PODATKOV

Meritve koncentracije selena v plazmi otrok so bile opravljene leta 2007 na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Njogoševa 4/I, Ljubljana. Podatke smo vnesli v statistični program SPSS in jih razdelili v tri skupine, glede na kraj bivanja. Vse tri skupine otrok smo nato razdelili še po spolu.

4.2 OBDELAVA PODATKOV

Najprej smo podatke vsake preiskovane skupine otrok statistično obdelali posebej. Nato pa smo skupinske rezultate primerjali z določenimi testi še med sabo.

4.2.1 Skupinska analiza

Najprej smo s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa testirali normalno porazdelitev koncentracij Se v vsaki skupini, hkrati pa smo s tem testom izračunali še povprečno vrednost in standardno deviacijo. S pomočjo različnih histogramov smo potem prikazali rezultate. Povprečno vrednost in standardno deviacijo smo določili vsaki skupini koncentracij, obema spoloma posebej.

4.2.2 Analiza skupinskih rezultatov

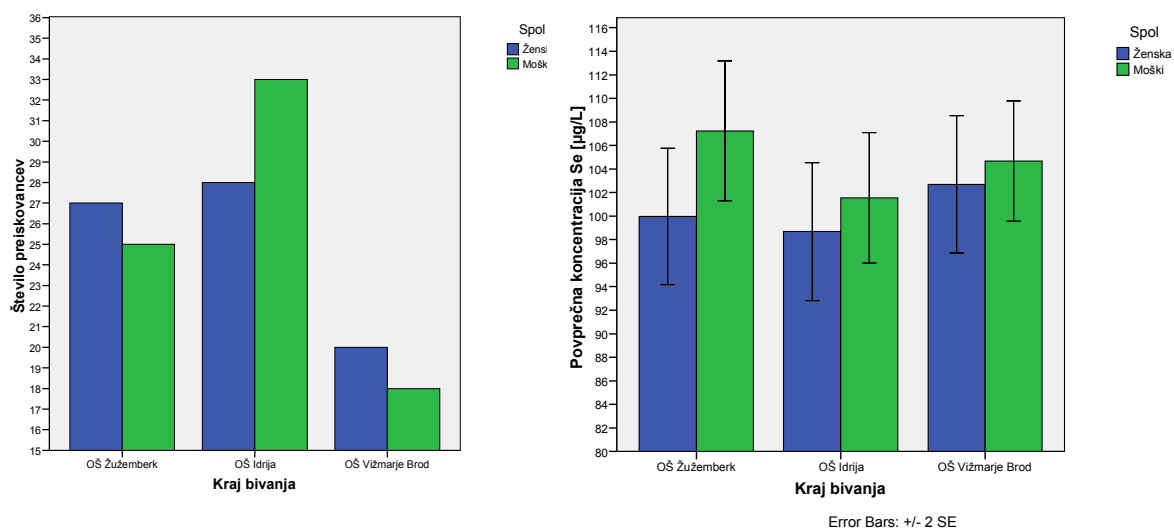
Najprej smo morali ugotoviti homogenost varianc med preiskovanimi skupinami. V ta namen smo uporabili Levenejevo statistiko. Ko smo ugotovili homogenost varianc, smo lahko uporabili enosmerni test ANOVA za testiranje hipoteze, da se povprečne vrednosti koncentracij Se med preiskovanci ne razlikujejo. Vse statistične teste smo opravili pri stopnji značilnosti 0,05.

5 REZULTATI

5.1 REZULTATI PO SKUPINAH

5.1.1 Osnovna šola Žužemberk

Za to skupino otrok smo predpostavljali, da živi v neobremenjenem, kmečkem okolju. Število preiskovanih otrok v skupini je bilo 52, od tega 27 deklic in 25 dečkov (slika 13).



Slika 13: Število preiskovancev in njihove koncentracije Se po spolu in kraju bivanja.

Vrednosti koncentracij Se v plazmi so se porazdelile normalno ($p > 0,05$), kot je razvidno iz slike 14. Povprečna koncentracija Se v plazmi te skupine otrok je bila $103 \mu\text{g/L}$. Vrednost je bila nad referentnim intervalom za normalno populacijo, ki znaša $55\text{-}101 \mu\text{g/L}$. Gledano po spolu, pa povprečna koncentracija Se v plazmi deklic pade v interval in znaša $100 \mu\text{g/L}$. Koncentracija Se v plazmi pri dečkih značilno presega referentni interval in znaša $107 \mu\text{g/L}$. Vrednosti grafično prikazuje slika 13.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		OŠ ŽUŽEMBERK
N		52
Normal Parameters(a,b)	Mean	103,46
	Std. Deviation	15,255
Most Extreme Differences	Absolute	,101
	Positive	,101
	Negative	-,067
Kolmogorov-Smirnov Z		,731
Asymp. Sig. (2-tailed)		,660

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Slika 14: Rezultati testiranja normalne porazdelitve vrednosti koncentracij Se v plazmi.

5.1.2 Osnovna šola Idrija

V Idriji se nahaja rudnik živega srebra, zato lahko iz rezultatov analize koncentracij Se v plazmi otrok iz tega predela, sklepamo, kako vpliva s težkimi kovinami obremenjeno okolje na status Se otrok. Rudnik v Idriji ne obratuje več in ima sedaj vlogo muzeja. Preiskovano skupino sestavlja skupaj 61 otrok, 28 deklic in 33 dečkov, kot je grafično prikazano na sliki 13. Vrednosti koncentracij Se v plazmi se porazdeljujejo normalno ($p > 0,05$), kot je razvidno iz slike 15.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		OŠ IDRIJA
N		61
Normal Parameters(a,b)	Mean	100,23
	Std. Deviation	15,696
Most Extreme Differences	Absolute	,147
	Positive	,147
	Negative	-,055
Kolmogorov-Smirnov Z		1,150
Asymp. Sig. (2-tailed)		,142

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Slika 15: Rezultati testiranja normalne porazdelitve vrednosti koncentracij Se v plazmi.

Povprečna koncentracija Se v plazmi te skupine otrok je 100 $\mu\text{g/L}$. Vrednost je v referentnem intervalu za normalno populacijo, ki znaša 55-101 $\mu\text{g/L}$. Tudi če gledamo po

spolu, padeta povprečni koncentracij deklic, 99 $\mu\text{g/L}$, in dečkov, 101 $\mu\text{g/L}$, v interval za normalno populacijo.

5.1.3 Osnovna šola Vižmarje Brod

Skupina preiskovanih otrok predstavlja vplive urbanega okolja na status selena v krvi. Preiskovano skupino sestavlja skupaj 38 otrok. 20 je deklic in 18 dečkov, vsi so prikazani na sliki 13. Vrednosti koncentracij Se v plazmi se porazdeljujejo normalno ($p>0,05$), kot je razvidno iz slike 16, ki prikazuje rezultate Kolmogorov-Smirnovega testa.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		OŠ VIŽMARJE BROD
N		38
Normal Parameters(a,b)	Mean	103,63
	Std. Deviation	11,933
Most Extreme Differences	Absolute	,105
	Positive	,093
	Negative	-,105
Kolmogorov-Smirnov Z		,644
Asymp. Sig. (2-tailed)		,801

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Slika 16: Rezultati testiranja normalne porazdelitve vrednosti koncentracij Se v plazmi.

Povprečna koncentracija Se v plazmi te skupine otrok je 104 $\mu\text{g/L}$. Vrednost je nad referentnim intervalom za normalno populacijo, ki znaša 55-101 $\mu\text{g/L}$. Tudi če skupino razdelimo po spolu, imata še vedno obe podskupini koncentracije Se v plazmi, ki so nad referentnimi. Pri deklicah znaša koncentracija selena v plazmi 103 $\mu\text{g/L}$, pri dečkih pa je 105 $\mu\text{g/L}$.

5.2 SKUPINSKA PRIMERJAVA REZULTATOV

5.2.1 Test homogenosti varianc

Za testiranje homogenosti varianc smo uporabili Levenejevo statistiko. Variance skupin so homogene ($p>0,05$), rezultat tega testa prikazuje slika 17. Rezultat je pomemben za izvedbo enosmerne ANOVA.

Test of Homogeneity of Variances

Se

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,551	2	148	,081

Slika 17: Rezultat Levenejevega testa.

5.2.2 Enosmerni test ANOVA

Rezultat enosmernega testa ANOVA je pokazal, da med skupinami ni značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi koncentracij selena v plazmi ($p > 0,05$). Rezultat testa prikazuje slika 18.

ANOVA

Se

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	397,488	2	198,744	,921	,400
Within Groups	31920,552	148	215,679		
Total	32318,040	150			

Slika 18: Rezultat enosmernega testa ANOVA.

Kljub rezultatu testa ANOVA, ki pravi da med aritmetičnimi sredinami koncentracij Se v plazmi ni statistično značilnih razlik, pa iz slike 19 razberemo, da se absolutne povprečne koncentracije Se (Mean) med skupinami razlikujejo. Vse namreč ne padejo v interval koncentracij za normalno populacijo (55-101 $\mu\text{g/L}$). Pri tem pa vse spodnje meje (Lower Bound) intervalov zaupanja za povprečne vrednosti Se dosežejo referentni interval, kar potrjuje rezultat testa ANOVA.

Descriptives

Se

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	52	103,46	15,255	2,116	99,21	107,71	73	135
2	61	100,23	15,696	2,010	96,21	104,25	74	140
3	38	103,63	11,933	1,936	99,71	107,55	77	130
Total	151	102,20	14,678	1,195	99,84	104,56	73	140

Slika 19: Primerjava nekaterih pomembnejših parametrov med preiskovanimi skupinami.

Le povprečna koncentracija Se v plazmi preiskovancev iz Idrije pade v referentni interval, vendar je tudi ta na zgornji meji, saj znaša nad 100 $\mu\text{g/L}$. Tudi v primeru, da združimo vse tri skupine v eno, je povprečna koncentracija Se nove skupine nad referentnim intervalom in znaša 102 $\mu\text{g/L}$. Standardna deviacija koncentracij Se v plazmi je najnižja v skupini OŠ Vižmarje Brod, ki znaša $\pm 11,933 \mu\text{g/L}$. Večjo SD imata ostali dve skupini, med katerima se le-ta malenkostno razlikuje.

5.2.3 Razlike med spoloma

Ne glede na kraj bivanja imajo preiskovane deklice nižjo koncentracijo Se v plazmi, ko le-to primerjamo s koncentracijo Se pri dečkih. To se jasno vidi na sliki 13. Pri pregledu ostalih parametrov med spoloma ne opazimo značilnih razlik, pri tem pa se moramo zavedati, da gre za ljudi pred puberteto, katerih organizem in presnova še nista popolnoma diferencirana. Iz tega razloga je potrebno vsake razlike, pripisane spolu, jemati z rezervo.

6 RAZPRAVA

Selen igra pomembno vlogo v presnovi sesalcev. Pomankanje selena lahko vodi v resne medicinske zaplete, zato je v določenih okoliščinah indicirano njegovo dodajanje v obliki dopolnil. Ker je območje med pozitivnim in toksičnim učinkom ozek, moramo biti pozorni tako na spodnjo, kot tudi na zgornjo mejo referentnega intervala. V naši raziskavi je bilo vključenih 151 vzorcev otrok starih od 7 do 9 let. Znano je, da je referentni interval za serumsko oz. plazemsko koncentracijo Se odvisen od starosti, zlasti pri otrocih. Zaradi prehranskih sprememb so serumske koncentracije značilno višje pri starejših otrocih, kot pri dojenčkih pred 1 letom starosti. Med 5. in 18. letom starosti, pa po rahli rasti, koncentracija selena doseže plato na 78,17 $\mu\text{g/L}$ [62].

Koncentracije selena v vseh treh skupinah so se porazdelile normalno ($p > 0,05$), prav tako so bile vse variance homogene ($p > 0,05$). Ugotovili smo, da se povprečne koncentracije Se v plazmi preiskovanih otrok značilno ne razlikujejo ($p > 0,05$). Iz tega lahko zaključimo, da se koncentracije selena v krvi značilno ne razlikujejo, glede na to v kakšnem življenjskem okolju živimo. Ko primerjamo koncentracije Se v plazmi otrok opazimo (glej sliko 13), da imajo dečki višje koncentracije Se kot deklice v vseh treh skupinah. Vendar opravljen t-test za neodvisna vzorca tega ni potrdil ($p > 0,05$). Značilnih razlik v koncentracijah Se med spoloma niso dokazali tudi v nekaterih drugih tujih raziskavah [62].

Povprečne vrednosti Se v vseh preiskovanih skupinah so na zgornji meji referentnega intervala, ali ga celo presegajo. Otroci iz osnovne šole Žužemberk, $c_{\text{Se}} = 103 \mu\text{g/L}$, in OŠ Vižmarje Brod, $c_{\text{Se}} = 104 \mu\text{g/L}$, so imeli koncentracije Se v plazmi, ki presegajo referentni interval, saj je le-ta 55-101 $\mu\text{g/L}$. Le otroci iz OŠ Idrija so imeli koncentracije Se v referentnem intervalu, $c_{\text{Se}} = 100 \mu\text{g/L}$. Ko pa smo vse tri skupine otrok razdelili v podskupine glede na spol, pa je povprečna koncentracija Se v plazmi deklic iz OŠ Žužemberk, $c_{\text{Se}} = 100 \mu\text{g/L}$, padla v referentni interval za normalno populacijo. V primeru preiskovancev iz OŠ Vižmarje Brod pa delitev po spolu ni prinesla sprememb. Tako so deklice te skupine še vedno presegale referentni interval s koncentracijo $c_{\text{Se}} = 103 \mu\text{g/L}$. Koncentracije Se vseh preiskovanih otrok (ko jih združimo v eno skupino ima le-ta povprečno koncentracijo Se $c_{\text{Se}} = 102 \mu\text{g/L}$) so visoke tudi, ko jih primerjamo z rezultati podobnih raziskav po svetu in doma (glej preglednico II). V podobni Slovenski raziskavi iz leta 1996, ko so ugotavljali status Se v serumu 71 otrok, starih 1-18 let iz SV predela

Slovenije so določili naslednje koncentracije Se: najmlajša starostna skupina (1-2 leti) je imela 74,9 +/- 9,7 µg/L; predšolska starostna skupina (3-5 let) 85,5 +/- 10,0 µg/L; in skupina šolajočih otrok (11-13 let) 93,9 +/- 9,3 µg/L [63].

Preglednica II: primerjava povprečnih koncentracij. Se v serumu preiskovancev po državah (preglednica je iz članka [62]).

Država	Skupinska povprečna koncentracija µg/L	Interval povprečnih koncentracij µg/L	Število vzorcev	Statostni interval, leta
Avstrija	48	34-60	109	1-15
Avstrija	51	47-53	65	1-19
Finska	58	51-73	26	1-15
Belgija	60	40-66	28	1-15
Slovaška	60	59-61	891	11-18
Francija	63	61-64	118	2-5
Nemčija	66	46-73	120	1-18
Francija	67	58-74	186	3-16
Finska	69	69 ^b	119	0.5-14.7
Anglija	74	65-78	70	2-16
Nemčija	77	74-79	844	1-18
Italija	84	80-88	217	12-13
Japonska	84	73-94	99	1-15
Slovenija	85	75-94	71	1-13
Nemčija	87	82-92	58	1-20
Turčija	89	86-92	80	1-16
ZDA	107	107 ^b	83	1-18
Kanada	126	126 ^b	40	1-9

^b podana je bila samo ena srednja vrednost

Tako je povprečna koncentracija Se vseh treh preiskovanih skupin v naši raziskavi 102 µg/L in je za 20% višja, kot iz podobne slovenske raziskave iz leta 1996. Pri tem pa so leta 1996 koncentracijo selena določevali v serumu, v naši raziskavi pa v plazmi. Koncentracije Se v krvi slovenskih otrok so primerljive s koncentracijami Se otrok v

raziskavi iz ZDA (glej preglednico II). Statistična primerjava rezultatov serumskega Se zdravih pediatričnih populacij 17-ih študij iz 13 držav sicer ni mogoča zaradi različnih eksperimentalnih postopkov in neskladnih metod povzemanja podatkov in deloma zaradi majhnih preiskovanih skupin [62].

7 SKLEPI

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti ali se koncentracije Se v krvi oziroma v plazmi preiskovanih otrok značilno razlikujejo glede na to kje v Sloveniji, oziroma v kakšnem življenjskem okolju živimo.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Kljub dejstvu, da lastnosti zemlje, iz katere rastline, ki so neposredni in posredni (živalsko meso, mleko, itd.) vir prehrane za človeka, rastejo, vplivajo na količino zaužitega selena, pa se le-te lastnosti zemlje v različnih življenjskih okoljih ne razlikujejo v takšni meri, da bi to značilno vplivalo na status selena Slovencev.
- V Idriji se nahaja rudnik živega srebra, ki ni več v obratovanju. To območje Slovenije je obremenjeno s težkimi kovinami. Kljub temu pa pri prebivalcih tega območja ni zaznati pomembnega vpliva okolja na njihov status Se.
- Slovenski otroci zaužijejo relativno visoke količine Se. Ko primejamo koncentracije Se v plazmi (ali serumu) slovenskih otrok s koncentracijami Se otrok iz nekaterih drugih držav po svetu, lahko zaključimo, da je selena v prehrani slovencev dovolj.
- V nekaterih predelih Slovenije imajo otroci povprečno koncentracijo selena v plazmi, ki že presega referentni interval za normalno populacijo. Vendar je glede na relativno nizko preseganje referentnega intervala, to je od 2% do 3%, malo verjetno, da bi bila le-ta koncentracija že toksična.
- Koncentracije selena v plazmi deklic in dečkov se razlikujejo, vendar ne statistično značilno. Pri deklicah opazimo nižje koncentracije Se v plazmi, kot pri dečkih, ne glede na življenjsko okolje. Kljub temu, da razlike niso statistično značilne ($p > 0,05$), pa so dovolj velike, da v določenih primerih koncentracije Se v plazmi deklic padejo v interval referentnih vrednosti, medtem ko so koncentracije pri dečkih že nad intervalom.
- Na podlagi rezultatov raziskave iz leta 1996 in letošnje sklepamo, da se je količina zaužitega selena v tem času povečala. Povprečna koncentracija Se v serumu pri otrocih je bila leta 1996 85 $\mu\text{g/L}$, leta 2007 pa je bila koncentracija Se v plazmi otrok 102 $\mu\text{g/L}$. Pri tem pa so bili preiskovani otroci iz različnih predelov Slovenije in analizirani so bili različni vzorci, serum - plazma.

8 LITERATURA

1. Raymond L: The Importance of Selenium/Mercury Research in SeaFood and Health Factors (dostopano 17. 3. 2008). URL=[«www.wildpacificseafood.com/graphics/Astorialuncheonpresentation1.ppt»](http://www.wildpacificseafood.com/graphics/Astorialuncheonpresentation1.ppt).
2. WHO Trace elements in human nutrition and human health. Geneva, World Health Organization, 1996.
3. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V. Fluorine (dostopano 18. 3. 2008). URL=[«http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/F-en.htm»](http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/F-en.htm).
4. Kumar P: Clark M. Clinical MEDICINE. Fifth Edition, 2002, stran 239.
5. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V. Recommended daily intake of vitamins and minerals (dostopano 20. 3. 2008). URL=[«http://www.lenntech.com/recommended-daily-intake.htm»](http://www.lenntech.com/recommended-daily-intake.htm).
6. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V. Iodine (dostopano 21. 3. 2008). URL=[»http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/I-en.htm«](http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/I-en.htm).
7. IPCS INCHEM. Iodine (dostopano 26. 3. 2008). URL=[«http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/iodine.htm»](http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/iodine.htm).
8. Barker WH & Wood WB Jr: Severe febrile iodism during the treatment of hyperthyroidism. Jama, 1940, 114: 1029-1038.
9. Reynolds J: Martindale, the extra pharmacopeia, 29th ed. London, The Pharmaceutical Press, 1989 1184-1186.
10. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.: Iron (dostopano 2. 4. 2008). URL=[«http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Fe-en.htm»](http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Fe-en.htm).
11. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V. Copper (dostopano 2. 4. 2008). URL=[«http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Cu-en.htm»](http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Cu-en.htm).
12. Roth R: Cellular Nutrition: Nickel&Cobalt (dostopano 3. 4. 2008). URL=[«http://www.acu-cell.com/nico2.html»](http://www.acu-cell.com/nico2.html).
13. Selenium in nutrition, 1983. Washinton, National Academy Press.
14. Vovk S: Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Živilstvo, 2006.
15. Kazuo T. Suzuki: Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies. Journal of Health Science, 2005; 51: 107-114.
16. Dolinar A: Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.

17. The George Mateljan Foundation: Selenium (dostopano 3. 6. 2008).
URL=<http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=nutrient&dbid=95>«.
18. Seattle Cancer Care Alliance: Nutrition and Prostate Cancer (dostopano 19. 6. 2008).
URL=<http://www.seattlecca.org/patientsandfamilies/adultCare/clinicalProgs/prostate/Nutrition/Supplements.htm>«.
19. Nemško prehransko društvo, Avstrijsko prehransko društvo, Švicarsko društvo za raziskovanje prehrane in Švicarsko združenje za prehrano: Referenčne vrednosti za vnos hranil. 1. izdaja, Ministrstvo za zdravje, Ljubljana 2004.
20. Windisch W: Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. *Anal Bioanal Chem*, 2002; 372 : 421-425.
21. Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids, National academy press, Washington DC 2000: 285-324.
22. Combs G F Jr: Status of selenium in prostate cancer prevention. *British Journal of Cancer* 2004; 91, 195-199.
23. The Risk Assessment Information System. Toxicity Profiles: Toxicity Summary for Selenium (dostopano 21. 6. 2008). URL=http://rais.ornl.gov/tox/profiles/selenium_f_V1.shtml#t24«.
24. Oster O, Prellwitz W: The renal excretion of selenium. *Biol. Trace Elements Res.* 1990; 24:119-146.
25. Slika (dostopano 23. 6. 2008). URL=http://content.edgar-online.com/edgar_conv_img/2006/06/22/0000893220-06-001440_W21531FW2153102.GIF«.
26. Raymond F, Burk in Kristina E Hill. Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 2005; 25:215-235
27. Song-Yuan Liu in Thressa C S: Selenophosphate Synthetase: Enzyme Labeling Studies with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{ATP}$, and $[^{75}\text{Se}]\text{Selenide}$. *ScienceDirect, Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997; 341: 353-359.
28. Wikipedia: Tetraiodothyronine 5' deiodinase (dostopano 24. 6. 2008).
URL=http://en.wikipedia.org/wiki/Tetraiodothyronine_5%27_deiodinase«.
29. Mustacich D, Powis G: Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 2000; 346: 1–8. PubMed Central, Journal List.

30. Baćac N: Vpliv nekaterih talnih lastnosti na frakcionacijo svinca in cinka v onesnaženih tleh celjske regije. Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, 2005.
31. WHO/ Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution: "Health Risks of Particulate Matter from Long-Range Transboundary Air Pollution." 2006.
32. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.: Mercury (dostopano 26. 6. 2008). URL=<http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Hg-en.htm>.
33. Kobal, A B, Horvat M, Prezelj M, Briški A S, Krsnik M, Dizdarevič T, Mazej D, Falnoga I, Stibilj V, Arnerič N, Kobal D, Osredkar J: The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2004; 17:261-274.
34. WHO: Task Group on Environmental Health. *Environmental Health Criteria 1 - Mercury*. Geneva 1976.
35. WHO: *Environmental Health Criteria 118. Inorganic Mercury*. World Health Organization, Geneva 1991.
36. Kosta L, Byrne AR, in Zelenko V: Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature* 1975; 254: 238-239.
37. Falnoga I, Kregar I, Tušek-Žnidarič M, Horvat M, in Stegnar P: Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and Mercury Mine workers. *Environmental Research Section A* 2000; 84: 211-218.
38. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G: Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *PubMed, AbstractPlus, Life Sci.* 1995; 56(2): 83-9.
39. Maths Berlin: *Interaction between Selenium and Inorganic Mercury*. *Environmental Health Perspectives* 1978; 25: 67-69.
40. Zajc A: Določanje živega srebra v različnih vrstah svežih in konzerviranih rib na slovenskem tržišču. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2006.
41. Chunying Chen, Hongwei Yu, Jiujiang Zhao, Bai Li, Liya Qu, Shuiping Liu, Peiqun Zhang in Zhifang Chail: The Roles of Serum Selenium and Selenoproteins on Mercury Toxicity in Environmental and Occupational Exposure. *Environ Health Perspect* 2006; 114(2): 297-301.

42. Raymond L: The Importance of Selenium/Mercury Research in SeaFood and Health Factors. Energy&Environmental Research Center Grand Forks, ND, 2007.
43. Kazuo Suzuki T, Chieka Sasakura in Shinji Yoneda: Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1998; 1429: 102-112.
44. Australian Government. Department of the Environment and Water Resurces: Lead and Compounds (dostopano 30. 6. 2008) . URL=<http://www.npi.gov.au/database/substance-info/profiles/pubs/lead-compounds.pdf>.
45. Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution: Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. WHO 2007.
46. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V. Lead (dostopano 30. 6. 2008). URL=<http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Pb-en.htm>.
47. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.: Cadmium (dostopano 1. 7. 2008). URL=<http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Cd-en.htm>.
48. U.S. Department for Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Cadmium 1999.
49. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.: Arsenium (dostopano 2. 7. 2008). URL=<http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/As-en.htm>.
50. eMedicine, Michael R Edwards: Toxicity, Aluminum (dostopano 3. 7. 2008). URL=<http://www.emedicine.com/med/TOPIC113.HTM#section~AuthorsandEditors>.
51. WHO: Trace elements in human nutrition and human health. Geneva, World Health Organization 1996.
52. Principles and methods for the assessment of risk from essential trace elements. *Environmental Health Criteria* 228. WHO 2002.
53. Younes M, Meek ME, Hertel RF, Gibb H, & Schaum J: Risk assessment and management. V: Herzstein JA, Bunn WB, Fleming LE, Harrington JM, Jeyarantnam J, & Gardner IR eds.: *International Occupational and Environmental Medicine*. St. Luis, Mosby 1998; 62-74.
54. Mazej D, Falnoga I, Stibilj V: Selenium determination in whole blood, plasma and selenoprotein P by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Acta Chim. Slov.* 2003; 50: 185-198.

55. D'Ilio S, Violante N, Caimi S, Di Gregorio M, Petrucci F in Senofonte O: Determination of trace elements in serum by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry: Developing of a method with a desolvating system nebulizer. *Analytica Chimica Acta* 2006; 573-574: 432-438.
56. Sam Huston State University: Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy (dostopano 7. 7. 2008). URL=<http://www.shsu.edu/~chemistry/primers/pdf/HGAAS.pdf>.
57. Cai Y: Speciation and analysis of mercury, arsenic, and selenium by atomic fluorescence spectrometry. *Trends in analytical chemistry* 2000; 17: 62-66.
58. Yang G, Wang S, Zhou R, Sun S: Endemic selenium intoxication of humans in China. *American Journal of Clinical Nutrition* 1983; 37: 872-881.
59. Reilly C: Selenium in food and health. London, Weinheim, New York. Blackie Academic & Professional 1996; 228-233.
60. International Programme on Chemical Safety: Selenium (dostopano 8. 7. 2008). URL=<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim483.htm>.
61. Metals in health and disease. Silicon (dostopano 10. 7. 2008). URL=<http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group29/silanut.htm>.
62. AC Muntau, M Streiter, M Kappler, W Roschinger, I Schmid, A Rehnert, P Schramel, AA Roscher: Age-related reference values for serum selenium concentrations in infants and children. *Clinical Chemistry* 2002; 555-560.
63. Micetic-Turk D, Turk Z, Radolli L: Serum selenium values in healthy children aged 1-18 years in NE Slovenia. *European Journal of Clinical Nutrition* 1996; 50(3):192-4.

9 PRILOGA

Podatki, uporabljeni v diplomski nalogi.

Zaporedna številka vzorca	OŠ ŽUŽEMBERK Koncentracija selena [µg/L]	OŠ IDRIJA Koncentracija selena [µg/L]	OŠ VIŽMARJE BROD Koncentracija selena [µg/L]
1	100	118	101
2	104	83	119
3	97	91	112
4	97	140	105
5	119	88	103
6	104	95	100
7	88	82	98
8	98	94	108
9	127	129	113
10	99	115	109
11	95	95	77
12	105	93	89
13	86	101	96
14	89	83	99
15	122	101	104
16	108	127	94
17	131	74	100
18	103	89	85
19	89	95	124
20	84	115	129
21	102	91	130
22	84	123	97
23	97	107	98
24	102	82	96
25	117	95	117
26	73	114	110
27	103	126	98
28	99	112	104
29	98	81	113
30	125	87	106
31	82	92	94
32	116	119	98
33	131	87	108
34	97	93	81
35	135	113	123
36	79	101	103
37	103	74	99
38	116	86	98
39	98	128	
40	91	94	
41	110	100	
42	90	109	
43	124	88	
44	92	122	

45	121	136	
46	128	106	
47	122	97	
48	112	109	
49	86	79	
50	82	96	
51	114	80	
52	106	113	
53		96	
54		90	
55		105	
56		92	
57		108	
58		102	
59		95	
60		89	
61		89	