

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA BERGANT

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA BERGANT

DOLOČANJE CINKA V KRVI PRI OTROCIH GLEDE NA TO,
ALI ŽIVIJO V MESTNEM, KMEČKEM ALI Z ŽIVIM
SREBROM OBREMENJENEM OKOLJU

DETERMINATION OF ZINC BLOOD CONCENTRATION IN
CHILDREN, WHETHER LIVING
IN URBAN, RURAL OR IN MERCURY LADEN
ENVIRONMENT

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega študija laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju za analizo encimov in elementov v sledovih na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo; Njegoševa 4/I, Ljubljana.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za strokovno svetovanje in pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala tudi Andreji Devetak za pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Najlepše pa se zahvaljujem svojim staršem za vso podporo in finančno pomoč pri študiju ter svoji družini Klemnu in Juliji, za spodbudo in pomoč.

Hvala tudi vsem ostalim.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Ljubljana, junij 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek

Kazalo

| | |
|---|----|
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 ESENCIALNI OLIGOELEMENTI..... | 2 |
| 1.1.1 Železo..... | 2 |
| 1.1.2 Baker..... | 2 |
| 1.1.3 Krom..... | 3 |
| 1.1.4 Mangan..... | 4 |
| 1.1.5 Jod..... | 4 |
| 1.1.6 Stroncij..... | 5 |
| 1.1.7 Molibden..... | 5 |
| 1.1.8 Kobalt..... | 6 |
| 1.1.9 Selen..... | 6 |
| 1.2 NEESENCIALNI OLIGOELEMENTI..... | 7 |
| 1.3 CINK..... | 9 |
| 1.3.1 Vnos cinka v telo..... | 10 |
| 1.3.2 Absorpcija cinka..... | 11 |
| 1.3.3 Presnova cinka..... | 12 |
| 1.3.4 Izločanje cinka..... | 12 |
| 1.3.5 Vloga cinka v človeškem organizmu..... | 14 |
| 1.3.5.1 Cink in hormoni..... | 15 |
| 1.3.5.2 Cink in encimi..... | 15 |
| 1.3.5.3 Cink in DNA..... | 16 |
| 1.3.6 Klinični znaki..... | 17 |
| 1.3.6.1 Povečana koncentracija cinka (Hipercinkemija)..... | 17 |
| 1.3.6.2 Zmanjšana koncentracija cinka (Hipocinkemija)..... | 17 |
| 1.3.6.3 Pomanjkanje cinka in oksidativni stres..... | 19 |
| 1.3.6.4 Pomanjkanje cinka in povečana občutljivost na oksidacijo..... | 20 |
| 1.3.6.5 Pomanjkanje cinka, celično signaliziranje in apoptoza..... | 20 |
| 1.3.6.6 Vpliv pomanjkanja cinka na razvoj raka..... | 20 |
| 1.3.6.7 Posamezniki, ki jim grozi pomanjkanje cinka [16]:..... | 21 |
| 1.3.7 Interakcije med nekaterimi pomembnimi hranili..... | 21 |
| 1.3.7.1 Baker..... | 22 |
| 1.3.7.2 Železo..... | 22 |
| 1.3.7.3 Kalcij..... | 22 |
| 1.3.7.4 Fitinska kislina..... | 23 |
| 1.3.7.5 Vitamin A..... | 24 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.3.8 | Viri cinka..... | 24 |
| 1.3.8.1 | Cink v hrani..... | 24 |
| 1.3.8.2 | Dodatki cinka..... | 26 |
| 1.3.9 | Samodiagnostika za pomanjkanje cinka: | 26 |
| 1.3.10 | Cink v tleh..... | 27 |
| 2 | NAMEN DELA | 28 |
| 3 | MATERIALI IN METODE | 29 |
| 3.3 | BIOLOŠKI VZORCI | 29 |
| 3.4 | REAGENTI..... | 29 |
| 3.5 | OPREMA | 29 |
| 3.6 | INSTRUMENT | 30 |
| 3.7 | KALIBRACIJA (UMERJANJE APARATA) | 30 |
| 3.8 | METODE DOLOČANJA CINKA..... | 31 |
| 3.8.7 | Atomska absorpcijska spektrofotometrija..... | 31 |
| 3.8.7.1 | Glavne komponente spektrometra | 34 |
| 4 | EKSPERIMENTALNI DEL | 36 |
| 5 | REZULTATI | 37 |
| 5.1 | REZULTATI PO SKUPINAH..... | 37 |
| 5.1.1 | Osnovna Šola Vižmarje-Brod | 39 |
| 5.1.2 | Osnovna šola Žužemberk | 41 |
| 5.1.3 | Osnovna šola Idrija..... | 43 |
| 5.2 | PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMI | 46 |
| 5.2.1 | Levenejev test..... | 46 |
| 5.2.2 | Enosmerni test ANOVA..... | 46 |
| 5.2.2.1 | Dečki | 48 |
| 5.2.2.2 | Deklice | 49 |
| 6 | RAZPRAVA..... | 50 |
| 7 | SKLEP | 53 |
| 8 | LITERATURA | 54 |
| 9 | PRILOGA..... | 57 |

POVZETEK

V preteklosti je bila pozornost usmerjena bolj k preučevanju toksičnosti cinka, danes pa je večji problem pomanjkanje tega elementa. Glede na vlogo cinka pri deljenju celic, sintezi proteinov in rasti, njegovo pomanjkanje predstavlja še posebej visoko tveganje za novorojenčke, otroke, adolescente in nosečnice.

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali se koncentracije cinka v krvi otrok razlikujejo glede na to, ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju. Zanimalo nas je tudi, ali ima rudnik živega srebra v Idriji kakšen vpliv na koncentracijo cinka pri otrocih iz OŠ Idrija, zato smo v ta namen statistično obdelali 173 vzorcev otrok starih od 8 do 11 let. Uporabljeni rezultati so bili pridobljeni leta 2007 na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani. Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili statistična programa Microsoft Excel in SPSS 17.0 za Windows.

Referenčni interval za koncentracijo cinka je zelo odvisen od starosti in spola, v našem primeru je bil referenčni interval 10,0-19,7 $\mu\text{mol/L}$.

Vrednosti povprečno niso v nobenem kraju presegle referenčnega intervala. Najprej smo analizirali podatke za vsako osnovno šolo posebej. Povprečna koncentracija otrok iz OŠ Žužemberk je bila najvišja, in sicer 12,60 $\mu\text{mol/L}$, otroci iz OŠ Idrija so imeli nekoliko nižjo povprečno koncentracijo, ki je znašala 11,06 $\mu\text{mol/L}$. Skupina otrok iz OŠ Vižmarje-Brod pa je imeli v povprečju najnižjo koncentracijo Zn, to je 10,48 $\mu\text{mol/L}$. Na podlagi primerjave rezultatov med posameznimi skupinami smo ugotovili, da se koncentracija Zn statistično značilno razlikuje glede na to, v kakšnem življenjskem okolju živijo otroci. Na koncu pa smo primerjali koncentracijo Zn v krvi glede na spol. Ugotovili smo, da se skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrija statistično značilno ne razlikujeta in tudi skupini deklic iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrija se statistično značilno ne razlikujeta.

Iz rezultatov je razvidno, da imajo največ cinka v krvi otroci iz podeželja. Iz tega lahko sklepamo, da je hrana z visoko vsebnostjo cinka na podeželju boljše kvalitete in da ljudje na podeželju niso podvrženi vegetarijanstvu.

ABSTRACT

In the past the focus was more to examine the toxicity of zinc, today however, a major problem is a lack of this element. Regarding the role of zinc in cell division, protein synthesis and growth the lack of it represents particularly high risk for infants, children, adolescents and pregnant women.

In our study we wanted to determine whether the zinc concentration in the blood of children vary according to whether they live in urban or rural environment or environment laden with mercury. We were also wondering whether the mercury mine in Idrija has any effect on the concentration of zinc in children from Idrija elementary school, and to this end, we statistically analyzed 173 samples of children aged 8 to 11 years. Used results were obtained in 2007 at the Clinical Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry in Ljubljana. For the statistical processing of results we used the statistical programs Microsoft Excel and SPSS 17.0 for Windows.

Reference interval for the concentration of zinc is highly dependent on age and sex, in our case, the interval is from 10.0 to 19.7 $\mu\text{mol} / \text{L}$.

The average values in each town are not beyond the reference interval. First, we analyzed the data for each elementary school in particular. The average concentration in children from Žužemberk elementary was the highest at 12.60 $\mu\text{mol} / \text{L}$, the children from Idrija school had a slightly lower average concentration at 11.06 $\mu\text{mol} / \text{L}$. A group of children from elementary school Vižmarje-Brod has had the lowest average concentration of Zn, it was 10.48 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Based on a comparison of results between different groups, we found that the concentration of Zn varies significantly depending on environment children live in. Finally, we compared the concentration of Zn in the blood regarding on gender. We found that a group of boys from school Vižmarje-Brod and school Idrija do not differ significantly and the group of girls from same schools do not differ significantly as well.

The results suggest that the children from rural areas have the highest blood concentration of zinc. It can be concluded that foods with high zinc content in the countryside is better quality and people in rural areas are not subjected to vegetarianism.

SEZNAM OKRAJŠAV

AA atomska absorpcija

AAS atomska absorpcijska spektroskopija

APE apirimidinska endonukleaza

μCi curie-enota za aktivnost radioaktivnega vira

DNA deoksiribonukleinska kislina

KA karbonska anhidraza

OŠ osnovna šola

RDI (Reference Daily Intake) priporočen dnevni vnos

RNA ribonukleinska kislina

ROS reaktivne kisikove spojine

SOD superoksid-dismutaza

tRNA prenašalna ribonukleinska kislina

UV ultravijolični žarki

VIM 1993 Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie,
skupna izdaja ISO/IEC/OIML/BIPM iz leta 1993

ZMA cink metionin aspartat

1 UVOD

Telo za svoje normalno delovanje vsak dan potrebuje določeno količino oligoelementov. Uravnotežena prehrana naj bi zadovoljila vse potrebe po teh snoveh, vendar moramo zaradi sodobnega hitrega tempa življenja, ki ga spremljajo neredna in neuravnotežena prehrana, delovna preobremenjenost in stres, zadostno količino mineralov in vitaminov v telo velikokrat vnašati v obliki prehranskih dopolnil, ki pripomorejo k zdravemu razvoju, ohranjanju zdravja in vitalnosti.

Dostikrat pa je v našem organizmu prisotnost teh elementov odvisna od količin le-teh v našem okolju, saj se nahajajo v atmosferi, hrani in zemlji, vendar je njihova absorpcija (vnos v telo) počasna. Na koncentracijo oligoelementov v telesu vplivajo tudi industrijski odpadki, onesnaževanje kmetijskih kultur z zaščitnimi sredstvi in drugimi kemijskimi sredstvi, kar je velik problem današnjega časa [1].

Oligoelementi ali izraz elementi v sledovih, se uporablja za opisovanje različnih kemičnih elementov, ki se v telesu nahajajo v zelo nizkih koncentracijah, in sicer v mg/kg tkiva. Oligoelementi so zelo pomembni za žive organizme, potrebni so za normalno delovanje organizma, metabolnih procesov in za rast.

Na vnos oligoelementov v organizem in njihovo biološko uporabnost vplivajo številni faktorji. Pomemben vpliv na vnos oligoelementov v organizem ima tudi njihova koncentracija v življenjskem okolju človeka [2].

Oligoelemente delimo na:

- esencialne in
- neesencialne

Vsi esencialni in neesencialni oligoelementi so v organizmu in naravi najpogosteje prisotni v ionizirani obliki in praviloma vezani z ostalimi kemijskimi elementi.

1.1 ESENCIALNI OLIGOELEMENTI

Poznamo 11 esencialnih oligoelementov, ki se nalagajo v telesu in so potrebni za življenje in normalno delovanje organizma. Imajo življenjsko pomembno vlogo v normalnih fizioloških procesih in so sestavni deli encimov, ali pa so njihovi aktivatorji. Noben drug element ne more nadomestiti vloge posameznega elementa. Za esencialne oligoelemente je biokemijska vloga znana, njihovo pomanjkanje ali presežek vodi v poslabšanje življenjskih funkcij in različna bolezenska stanja. Njihovo pomanjkanje vodi v razvoj bolezenskih znakov, ki izginejo, če v telo apliciramo potrebno količino tega elementa, pri povišani koncentraciji pa se kažejo znaki zastrupitve.

Med esencialne oligoelemente prištevamo železo (Fe), baker (Cu), cink (Zn), krom (Cr), mangan (Mn), fluor (F), jod (I), stroncij (Sr), molibden (Mo), kobalt (Co) in selen (Se).

1.1.1 Železo

Je kemični element z znakom Fe in atomskim številom 26.

Železo je lesketajoča, srebrno-siva kovina in je kemijsko reaktiven element, ki ga pridobivamo iz rudnin, kot so magnetit, hematit, limonit in siderit [3]. Železo je esencialni element za človekov organizem. V telesu je železo v ionski obliki Fe^{2+} in Fe^{3+} . Železo je v telesu vezan na hemoglobin, transferin in feritin. Organizem lažje absorbira železo iz mesa (FeII), kot iz hrane rastlinskega izvora (Fe III). Kronično vdihavanje prekomerne koncentracije železovih (III) oksidov (Fe_2O_3) lahko povzroči siderozo in nastanek pljučnega raka. Odmerki večji od 20 mg lahko povzročijo okvaro želodca in zaprtost. Pomanjkanje železa vodi v anemijo. Pomembna funkcija železa v telesu je prenos kisika po krvi in v mišicah. Železo je tudi del encimskih sistemov pri prenosu elektronov in pri sintezi DNA. Pri nastanku prostih kisikovih radikalov je železo v vlogi katalizatorja.

Priporočljiv vnos železa je 15mg/dan [4].

1.1.2 Baker

Je kemični element z znakom Cu in atomskim številom 29.

Je rdečkasta kovina s kubično kristalno strukturo, je trd in dobro koven. Ima nizko kemijsko reaktivnost, na vlažnem zraku dobi zelenkasto površino-patina, ki ga varuje pred

nadaljnjim propadanjem [3]. Je zelo pogosta kovina, ki se v okolju naravno pojavlja in širi v okolje skozi naravne procese.

Baker najdemo v hrani, v pitni vodi in zraku. Baker je esencialni element za človekov organizem, zato je absorpcija bakra nujna. V telesu je prisoten v ionski obliki Cu^+ ali Cu^{2+} .

Dolgotrajna izpostavljenost bakru lahko povzroči draženje nosu, ust in oči, pride pa lahko tudi do glavobola, vrtoglavic in driske. Kronična zastrupitev z bakrom povzroča Wilsonovo bolezen, povzroči lahko jetrno cirozo, poškodbe možganov, ledvične bolezni in odlaganje bakra v roženici.

Baker kot sestavina encima ceruloplazmina iz hrane izloča železo in ga uporablja za nastajanje krvi. Baker podpira presnovo beljakovin, pomaga pri obnovi živcev, podpira izmenjavo kožnih in lasnih barvil, sodeluje pri gradnji kondroitinsulfata, temeljnega kostnega tkiva (pomembno hranilo v primerih artroze in revme), pomemben je pri preprečevanju poapnenja žil (ateroskleroza).

Priporočljiv vnos bakra je 2mg/dan [4].

1.1.3 Krom

Je kemični element z znakom Cr in atomskim številom 24.

Krom je trdna kovina, srebrno sive barve, ki jo je zelo lahko polirati. Je nestabilen na kisiku, na površini nastane tanka oksidna plast, ki ne prepušča kisika in ga tudi varuje pred kisikom.

Krom pride v naše telo z dihanjem (Cr(VI)), hrano, pijačo ali s kožo. Raven kroma je običajno v zraku in vodi nizka. V telesu je krom prisoten v 3+ ali 6+ valentni obliki.

Krom se nahaja v zelenjavi, sadju, mesu, kvasu in žitaricah. Ljudje s hrano zaužijemo krom v trivalentni obliki (Cr(III)). Pomanjkanje Cr(III) povzroči težave v presnovi, bolezni srca in diabetes. Previsoka koncentracija Cr(III) pa povzroča kožne izpuščaje.

Cr(VI) je za človeka nevaren, predvsem za ljudi, ki delajo v kovinski in tekstilni industriji ter za kadilce. Cr(VI) povzroča alergijske reakcije, kožne izpuščaje, težave z dihali in tudi pljučnega raka.

Priporočljiv vnos kroma je 120 μg /dan [4].

1.1.4 Mangan

Je kemični element z znakom Mn in atomskim številom 25.

Mangan je kemijsko reaktiven element, sivo-rožnate barve. Je trdna in zelo krhka kovina, ki se težko tali, a zlahka oksidira. Mangan je eden najbolj bogatih kovin v tleh, kjer se nahaja v obliki oksidov in hidroksidov.

Glavna pot vnosa mangan v naše telo je s hrano (Mn^{2+}) in pijačo. V telesu se nahaja vezan na proteine in to v 2+ valentni obliki.

Največ mangana se nahaja v rižu, soji, jajcih, oreških, ostrigah in v olivnem olju. Povišana koncentracija mangana v telesu povzroči Parkinsonovo bolezen, pljučno embolijo in bronhitis. Moški pri daljši izpostavljenosti manganu lahko postanejo neplodni. Pomanjkanje mangana pa lahko povzroči debelost, težave s kožo in lahko se zniža raven holesterola.

Priporočljiv vnos mangana je 5mg/dan [4].

1.1.5 Jod

Je kemični element z znakom I in atomskim številom 53.

Jod je lesketajoč nekovinski trden element vijolično-črne barve. Je najbolj elektropozitiven in najmanj reaktiven med halogeni. Dobro topen je v nekaterih organskih topilih (tetraklorometan), slabo pa je topen v vodi. Nahaja se v vseh soleh, v naravi pa ga najdemo v morju, morskih ribah in rastlinah, nekaj pa ga je tudi v zraku in zemlji. Največ joda se nahaja v oceanih. Sestavlja ščitnične hormone, ki so nujno potrebni za rast, živčni sistem in presnovo. Zaradi pomanjkanj joda v organizmu se zniža delovanje ščitnice, zato začne ščitnica otekati-struma ali golša. Takšno stanje je danes redko, saj se vsa sol jodira. Elementarni jod (I_2) je strupen, saj njegova para draži oči in pljuča. Najvišja dovoljena koncentracija v zraku pri delu z jodom je $1\text{mg}/\text{m}^3$ [3]. Vsi jodidi so strupeni, če jih zaužijemo v preveliki količini. Vnašanje previsokih količin dalj časa lahko privede do jodizma, pri tem pride do hipersalivacije, prehlada, kihanja, konjunktivitisa, stomatitisa, povečanja podčeljustne žleze slinavke in kožnih izpuščajev [6]. Smrtna odmerka je okoli 2-3g [6].

Priporočljiv vnos joda je $150\mu\text{g}/\text{dan}$ [4].

1.1.6 Stroncij

Je kemični element z znakom Sr in atomskim številom 38.

Stroncij je mehka, srebrno-rumena, zemeljsko alkalijska kovina. Njegove fizikalno-kemijske lastnosti so podobne kalciju in bariju. Stroncij močno reagira z vodo in zrakom, zato ga je potrebno ustrezno shranjevati, da ne pride v stik z zrakom in vodo. Zaradi reaktivnosti z zrakom se stroncij vedno pojavlja v kombinaciji z drugimi elementi in spojinami. Stroncijeve spojine, ki so v vodi netopne, lahko postanejo v vodi topne kot posledica kemičnih reakcij. Vodotopne oblike stroncija lahko onesnažijo pitno vodo, vendar so koncentracije v pitni vodi dokaj nizke. Stronciju smo ljudje izpostavljeni preko zraka, s hrano, pitno vodo, prahu ali pri stiku z zemljo (SrSO_4 in SrCO_3), ki vsebuje stroncij. Živila, ki vsebujejo zelo visoko koncentracijo stroncija, so listnata zelenjava in mlečni izdelki. Za ljudi je nevaren stroncij v obliki stroncijevega kromata, ki povzroča pljučnega raka. Povišana koncentracija pri odraslem človeku ne povzroča nobenih motenj, pri otrocih pa lahko povzroči težave pri rasti kosti. Radioaktivni stroncij v povišani koncentraciji povzroča anemijo in pomanjkanje kisika, v zelo visokih koncentracijah pa lahko tudi raka (posledica poškodbe genskega materiala).

Priporočljiv vnos stroncija je 2mg/dan [5].

1.1.7 Molibden

Je kemični element z znakom Mo in atomskim številom 42.

Molibden je srebrno bela in zelo trda kovina. Med čistimi elementi ima molibden eno izmed najvišjih temperatur tališča (2610 °C). Molibden je manj topen v kisli zemlji in bolj topen v alkalni zemlji, po tem se molibden tudi razlikuje od ostalih oligoelementov. Molibden in njegove spojine so zelo toksične, saj pri kronični izpostavljenosti privedejo do okvare jetrnih funkcij s hiperbilirubinemijo. Povišana koncentracija molibdena v organizmu povzroča bolečine v sklepih kolen, rok, nog, deformacijo sklepov, edem na predelu sklepov in eritem.

Priporočljiv vnos molibdena je 75µg/dan [4].

1.1.8 Kobalt

Je kemični element z znakom Co in atomskim številom 27.

Kobalt je srebrno-bela svetlikava in trda kovina. Ljudje smo pogosto izpostavljeni kobaltu, saj je prisoten povsod v okolju, pa tudi v zraku (CoO), kjer je zelo stabilen, v vodi, prsti, živalih, rastlinah ter v hrani.

Pri stiku z zemljo ali vodo, ki vsebuje kobalt, se lahko poveča izpostavljenost temu elementu. Kobalt je zelo koristen za ljudi, saj je del vitamina B12, ki pa je ključnega pomena za zdravje ljudi. Uporablja se za zdravljenje slabokrvnosti pri nosečnicah, saj spodbuja nastajanje rdečih krvnih celic [3]. Visoke koncentracije kobalta v telesu so škodljive za zdravje. Povišana koncentracija kobalta povzroča slabost, bruhanje, težave z vidom in s srcem. Pri izpostavljenosti sevanju radioaktivnih izotopov kobalta pa lahko povzroči neplodnost, izpadanje las, bruhanje, krvavitev, drisko, komo in celo smrt. Včasih se to sevanje uporablja pri bolnikih z rakom, da uničijo tumorske celice.

Priporočljiv vnos kobalta je 10-20 μ g/dan [7].

1.1.9 Selen

Je kemični element z znakom Se in atomskim številom 34.

Selen je nekovinski kemijski element in je kemijsko podoben žveplu in telurju. Najdemo ga v različnih oblikah:

- v obliki rdečega amorfnega prahu, rdečem kristalnem materialu in
- v metalno sivi kristalni obliki.

Ljudje smo selenu izpostavljeni na več različnih načinov, preko hrane, vode, pri stiku z zemljo (Selenat) ali z vdihavanjem zraka, če ta vsebuje visoke koncentracije selena. Selen je v okolju zelo razširjen, v naše telo pa ga vnašamo predvsem s hrano. V telesu je prisoten v obliki selenocisteina in selenometionina. Živila, ki vsebujejo zelo visoko koncentracijo selena in so tako bogat vir tega elementa, so pšenični kalčki, otrobi, rjavi riž, polnozrnat kruh, ječmen, čebula, česen, repa, soja, gobe, ribe in jajca[3]. S hrano običajno dobimo zadostno količino selena, da ne pride do pomanjkanja. Pri pomanjkanju selena lahko pride do težav s srcem in mišicami.

Pri delu s selenom lahko zaradi prevelike koncentracije postanemo omotični, utrujeni ali pa draži sluznico. Povišana koncentracija tega elementa v telesu povzroči krhke lase in nohte, izpuščaje, otekanje kože in hude bolečine, stik selena z očmi pa povzroča pekoč občutek, draženje in solzenje. Prekomerna izpostavljenost njegovim hlapom povzroči nabiranje tekočine v pljučih, oteženo dihanje, bronhitis, pnevmonitis, bronhialno astmo, slabost, mrazenje, povišano telesno temperaturo, glavobol, boleče grlo, težko dihanje, konjunktivitis, bruhanje, bolečine v trebuhu, drisko in povečanje jeter [3].

Zastrupitev s selenom lahko privede do smrti.

Priporočljiv vnos selena je 35 μ g/dan [4].

Tabela 1: Esencialni oligoelementi v človeškem telesu in krvi [5]:

| Element | Količina v telesu (mg) | Nahajanje v % | Kri (mg) | Plazma (mg) | Eritrociti (mg) |
|----------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|------------------------|
| Železo (Fe) | 4200 | 70,5 % v Hb | 2500 | 3,6 | 2400 |
| Fluor (F) | 2600 | 99 % kosti | 0,95 | 0,87 | 0,17 |
| Cink (Zn) | 2300 | 65 % mišice | 34 | 5,6 | 28 |
| Stroncij (Sr) | 320 | 99 % kosti | 0,18 | 0,17 | 0,01 |
| Baker (Cu) | 120 | 34 % mišice | 5,60 | 3,50 | 2,20 |
| Selen (Se) | 13 | 38,3 % mišice | 1,10 | ---- | ---- |
| Mangan (Mn) | 12 | 43,4 % kosti | 0,14 | 0,025 | 0,12 |
| Jod (I) | 11 | 87,4 % ščitnica | 0,29 | 0,26 | 0,035 |
| Molibden(Mo) | 9,3 | 19 % jetra | 0,0083 | ---- | ---- |
| Krom (Cr) | 1,7 | 37 % koža | 0,14 | 0,074 | 0,044 |
| Kobalt (Co) | 1,5 | 18,6 % v KH | 0,0017 | 0,0014 | 0,0003 |

Poznamo 11 esencialnih elementov, opisanih pa je samo 9.

1.2 NEESENCIALNI OLIGOELEMENTI

V telesu se nahaja zelo majhna količina neesencialnih oligoelementov in so toksičnega izvora. Njihova bistvena biokemijska funkcija še ni znana. V telo pridejo s hrano in z

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

izpostavljenostjo visokim koncentracijam tem kovinam v okolju človeka. Biološko so pomembne samo previsoke koncentracije v organizmu saj povzročajo zastrupitve.

Med neesencialne oligoelemente spadajo naslednje težke kovine: živo srebro (Hg), kadmij (Cd), svinec (Pb), aluminij (Al), arzen (As), vanadij (V) in nikelj (Ni).

1.3 CINK

Cink je kot sestavina zlitin poznan že od bronaste dobe, kot element pa ga je prvi opisal nemški kemik Andreas Sigismunt Marggraf leta 1746 [9].

Cink(Zn) je kemični element, modrikasto bela krhka kovina. Cink ima vrstno število 30, relativno atomsko maso 65,37 g/mol, gostoto 7,11 g/cm³ in tališče 420°C [11]. Spada med nežlahtne kovine, je umirjeno reaktiven in reagira s kisikom in drugimi nekovinami. V razredčenih kislinah se živahno raztaplja, pri čemer se sprošča vodik. V kislih in nevtralnih raztopinah nastopa v hidratni, alkalni in hidroksidni obliki [9]. Čeprav poznamo več kot 80 mineralov, ki vsebujejo cink, za njegovo pridobivanje izkoriščamo le nekatere. Najpomembnejši so sfalerit ((ZnFe)S), wurtzit (ZnS), hemimorfit (ZnSi₂O₇(OH)₂)_x(H₂O)) in smithsonit (ZnCO₃) [9].

Oksidacijsko stanje cinka je +2.

Cink je zelo razširjen v naravi, zraku (na zraku je precej obstojen, ker se prevleče z zaščitno plastjo cinkovega oksida in bazičnega karbonata) in vodi. V naravi se nahaja kot cinkova svetlica (ZnS) in kot kalamina (silikat cinkovega hidroksida).

Veliko živil ga vsebuje v nizkih koncentracijah, tudi pitna voda vsebuje določeno koncentracijo cinka.

V naravi je cink vezan tudi v organskih spojinah:

- cinkov oksid (ZnO) - bel prah, ki nastane pri zgorevanju cinka; uporablja se kot slikarska barva - cinkovo belilo, ali kot posip in v mazilih - cinkovo mazilo,
- cinkov sulfid (ZnS) - sestavina svetlečih barv in prevlek na televizijskih zaslonih, v zmesi z barijevim sulfatom se uporablja kot barva litopon.

Cink pridobivajo z redukcijo iz sulfidov s pomočjo ogljikovega dioksida. Mogoče ga je dobiti tudi z elektrolizo cinkovega sulfata(VI) ali z redukcijo cinkovega oksida z ogljikom. Je četrta najbolj uporabljena kovina na svetu, takoj za železom, aluminijem in bakrom. Največji porabnik tega elementa je avtomobilska industrija, uporabljajo ga tudi kot antikorozijsko sredstvo, v farmacevtski industriji za proizvodnjo mazil in zdravil, v kemični industriji in kmetijstvu za proizvodnjo pripravkov za zaščito rastlin in kot

sestavino mineralnih gnojil [9]. Uporabljajo ga še za zlitine (medenina, novo srebro) in galvansko pocinkanje.

Glede na vsebnost v telesu in dnevne potrebe po njem ga uvrščamo med oligoelemente (mikrohranila oz. elemente v sledovih). Ocenjujejo, da je v človeškem telesu približno 2g cinka [5]. V Biološkem sistemu se cink nalaga samo v 2+ obliki.

Je mineral z raznovrstno in zelo pomembno vlogo v človeškem organizmu, ki se nahaja v vseh tkivih in telesnih tekočinah, največ pa ga je v [5]:

- skeletnem mišičju (60 %),
- kosteh (~30 %),
- koži (15 %),
- nohtih in
- lasih.

1.3.1 Vnos cinka v telo

Dnevno smo ljudje izpostavljeni nizkim koncentracijam cinka z uživanjem hrane, vode (zelo majhne količine) in dihanjem zraka (ZnO-Cinkov oksid).

Z normalno prehrano dnevno vnesemo zadostno količino cinka.

Po priporočilih DACH (to so nemške, avstrijske in švicarske referenčne vrednosti za vnos hranil, od leta 2004 pa veljajo tudi v Sloveniji) je priporočljiv dnevni vnos cinka za ženske 7 mg, za moške pa 10 mg. Med nosečnostjo in v obdobju dojenja se potrebe po cinku povečajo za 3 oziroma 4 mg na dan, saj je potreben za zagotavljanje normalne rasti in za razvoj dojenčka [12].

Tabela 2: Priporočene vrednosti za vnos Zn za različne starostne skupine [13]:

| STAROST | VNOS (RDI) Zn (mg/dan) moški /ženske |
|--------------------------------------|---|
| Dojenčki od 0 do 4 mesecev | 1 |

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

| | | |
|-------------------------------|-----|---|
| od 4 do 12 mesecev | 2 | |
| Otroci | | |
| od 1 do 4 let | 3 | |
| od 4 do 7 let | 5 | |
| od 7 do 10 let | 7 | |
| od 10 do 13let | 9 | 7 |
| od 13 do 15let | 9,5 | 7 |
| Mladostniki in odrasli | | |
| od 15 do 19 let | 10 | 7 |
| od 19 do 25 let | 10 | 7 |
| od 25 do 51 let | 10 | 7 |
| od 51 do 65 let | 10 | 7 |
| nad 65 let | 10 | 7 |
| Nosečnice (od 4. meseca) | 10 | |
| Doječe matere | 11 | |

1.3.2 Absorpcija cinka

Cink se v glavnem absorbira iz dvanajstnika, nekaj pa se ga absorbira v srednjem delu tankega črevesja. Mehanizem vključuje aktivni transport, ki ga omogočajo nizko molekularni ligandi iz trebušne slinavke. Ligandi vežejo cink in omogočajo transport na luminalno površino črevesnih epiteljskih celic. Od tam se cink prenese na vezavno mesto bazalne membrane, kjer se pritrudi na albumin in beljakovino transferin v portalnem obtoku. Intraluminalna prebava s pomočjo proteaz, DNAz, RNAz sprošča cink, tako da se tvorijo kompleksi s histidinom, cisteinom in nukleotidi, ki pa izboljšajo absorpcijo [17].

Absorpcija je delno odvisna od obstoječe vsebnosti in deloma od dnevnega vnosa. Odstotek absorbiranega cinka se giblje od 20 do 80 %, večina vrednosti pa od 20 do 30 %. Pri vnosu 12.2 mg cinka na dan, znaša delna absorpcija 26 %, pri zelo nizkem vnosu 0,23 mg cinka na dan, se delna absorpcija poveča na 100 % [18]. Pri povišanem vnosu kalcija in povišanem vnosu fitata, se zmanjšuje absorpcija cinka zaradi tvorbe netopnega kompleksa kalcij-cink-fitat. Previsok vnos železa in prenizek vnos proteinov pa zmanjšuje absorpcijo.

Na absorpcijo cinka lahko vplivajo tudi druge kovine, npr. baker. Obe kovini imata skupno absorpcijsko pot, ko se vežeta na sulfhidrilno bogat protein v citosolu dvanajstnika. Podoben mehanizem vezave ima tudi kadmij. Cink iz živalskih virov se bolje absorbira kot iz rastlinskih [19].

1.3.3 Presnova cinka

Absorbirani cink se prenaša v jetra s portalnim obtokom, kjer poteka aktivna vključitev v metaloencime in plazemske proteine, kot so albumini in α_2 -makroglobulini. Krvna plazma vsebuje manj kot 1 % celotne vsebnosti cinka v telesu in ga vzdržuje znotraj ozkega koncentracijskega intervala 80-120 $\mu\text{g/dL}$ (12-18 $\mu\text{mol/L}$). Približno 80 % cinka v plazmi je povezanega z albuminom, večina preostalega pa je tesno vezana na visoko molekularni protein α_2 -makroglobulin. Cink vezan na albumin je v ravnovesju s plazemskimi aminokislinami in ta majhen del, ki se da ultrafiltrirati, je lahko pomemben pri mehanizmu celičnega privzema. Skupaj odraslo telo vsebuje približno 2 g do 2,5 g cinka, ki je prisoten v vseh celicah presnovno aktivnih tkiv in organov. Skoraj ves cink v rdečih krvničkah se nahaja v obliki karboanhidraze, tako da je koncentracija cinka v rdečih krvničkah približno 10-krat višja kot v plazmi. Hemolizati imajo običajno približno 50 μg cinka na g Hb. Celotna koncentracija cinka v levkocitih je normalno okoli $100 \pm 25 \mu\text{g}/10^{10}$ celic.

1.3.4 Izločanje cinka

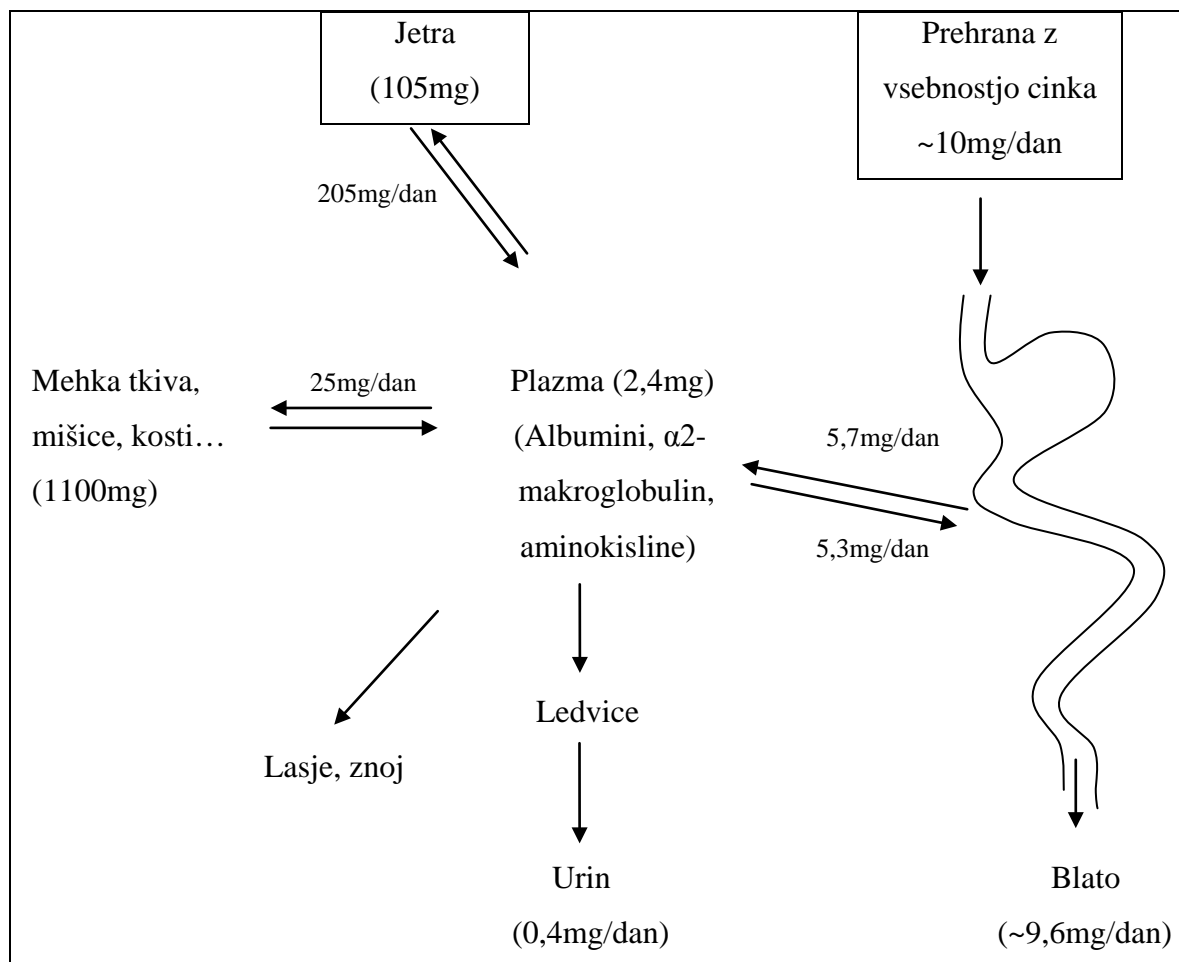
Iz telesa se največ cinka izloči z blatom, v manjši meri pa z urinom, znojem, skozi kožo, lase in z ejakulatom. Pri tem je količina izločenega cinka z blatom običajno enaka skupnemu vnosu cinka pri zdravi populaciji (okrog 10-15 mg/dan) [18]. Izločanje z blatom vključuje neabsorbiran cink, z majhnimi prispevki iz črevesnih celic, trebušne slinavke in žolčnika. Izgube z blatom, ki vključujejo hrano in endogene izločke, so lahko tudi manjše kot 1 mg/dan.

Skoraj ves cink v krvi tvori komplekse z velikimi beljakovinami, albumini ali α_2 -makroglobulini, zato je zelo malo cinka v glomerularnem filtratu, zato z urinom dnevno izgubimo zelo malo cinka, približno 0.5 mg. Izrazito pa se poveča pri katabolnih boleznih. Sprostitev znotrajcelične vsebine iz skeletnih mišic je bila vzpostavljena kot vir presežka cinka v urinu v pooperativnem obdobju z uporabo radioaktivnih cinkovih označevalcev.

Dva bolnika sta dobila peroralni odmerek radioaktivnega cinka $5 \mu\text{Ci}$, približno en mesec pred načrtovanim operativnim posegom zamenjave celotnega kolka, ki omogoča vključitev sledljive snovi v skeletnih mišicah.

Koncentracija radioaktivnega cinka, celotnega cinka in vsega dušika pri izločanju s sečem je bila izmerjena pred operacijo in 3 tedne po njej. Opazna je bila dobra povezava med radioaktivnim cinkom in celotnim cinkom v urinu obeh bolnikov. Stradanje poveča izločanje cinka z urinom za več kot 3-krat, pojavi se kot posledica sproščanja iz skeletnih mišic in pri izločanju ketonskih teles [17]. Dnevne izgube cinka z znojem, skozi kožo in lase pa znašajo približno 1 mg. Iz telesa se izloča tudi z ejakulatom, ki vsebuje približno 0,5 mg cinka [18].

Slika 1: Presnova cinka [19]:



1.3.5 Vloga cinka v človeškem organizmu

Izmed vseh elementov v sledovih je cink prisoten v telesu v največji meri. Pomembno vlogo ima v biokemičnih procesih, saj ga vsebuje več kot 60 encimov. Sodeluje pri sintezi genskega materiala, beljakovin in ima vlogo antioksidanta. Potreben je za sintezo proteina, ki odloča o prenosu vitamina A. Ob pomanjkanju cinka se izrazijo tudi simptomi pomanjkanja vitamina A, čeprav je vnos vitamina A optimalen. Cink ima pomembno vlogo pri ohranjanju vitamina E v telesu, saj preprečuje izgubo tega vitamina iz telesnih tkiv. Vse to pomaga pri boju s prostimi radikali. Cink ima tudi pomembno vlogo v različnih celičnih regulacijskih procesih, kot so signaliziranje med celicami, prenos živčnih dražljajev ter apoptoza (programirana celična smrt, ki jo označuje krčenje vsebine, razpad jedra in citoplazme v telesca, obdana z membrano, odstranitev iz tkiva in razgradnja v fagocitih ali v istovrstnih celicah s povečano fagocitno sposobnostjo), katerih delovanje je ključno za rast in razvoj ter pojav mnogih kroničnih obolenj. Spodbuja delovanje imunskega sistema, izdelavo protiteles in limfocitov T ter obrambno dejavnost belih krvničk (levkocitov).

Cink ima velik vpliv na DNA, njeno podvajanje, transkripcijo in popravljanje. Sodeluje namreč pri gradnji več kot 3000 transkripcijskih faktorjev, več kot 300 encimov, poleg tega pa tudi pri številnih proteinih za popravljanje DNA. Cink je torej nujno potreben za obrambo celice pred oksidacijo oz. poškodbami DNA.

Cink sodeluje pri različnih zelo pomembnih fizioloških funkcijah:

- rast in delitev celic,
- spolno dozorevanje,
- reprodukcija,
- prilagajanje vida temi,
- celjenje ran (pospeševanje),
- prispeva k obrambni sposobnosti organizma (reakcije imunskega sistema),
- sodeluje v presnovi nekaterih vitaminov,
- sodeluje pri delovanju čutil (vonj, okus) ter
- stimulira keratinizacijo kože.

1.3.5.1 Cink in hormoni

Hormoni potujejo s krvjo in prenašajo sporočilo od celice do celice. Cink je komponenta mnogih hormonov, ki so povezani z rastjo, prehranjevanjem, odzivom imunskega sistema in razmnoževanjem.

Povezan je s tvorbo leptina, hormona, ki daje občutek sitosti, zavira apetit in z delovanjem na ščitnične hormone vpliva na hitrost, s katero porabljammo zaužite kalorije. Cink lahko deluje tudi v obratnem procesu.

Če gremo od apetita k prebavi in izrabi hrane, se ponovno srečamo s cinkom, saj je inzulin kot eden glavnih presnovnih hormonov sestavljen kar iz 3 % cinka. Cink kot sestavina inzulina-cinkovega kompleksa povečuje učinek inzulina in s tem pozitivno (uravnava) deluje na količino maščob in sladkorja v krvi.

Spodbuja delovanje imunskega sistema, izdelavo protiteles in limfocitov-T pa tudi samo obrambno dejavnost belih krvničk (levkocitov). Otroci in odrasli, ki jim primanjkuje cinka, so večkrat (ali celo kronično) prehlajeni in zelo dovzetni za okužbe dihalnih poti. Cink lahko celo izboljša imunske funkcije, ki se po 60. letu starosti hitro slabšajo. Že po puberteti se namreč začne žleza timus (pomemben organ imunskega sistema) naglo krčiti. Timus (imenovan tudi priželjc, ki se nahaja za grodnico) izloča timulin, hormon, ki spodbuja nastajanje T-celic. Ker se ta žleza z leti vse bolj krči (zmanjšuje - krni), se zmanjšuje tudi izločanje timulina in število T-limfocitov strmo pada, s tem pa slabi imunski sistem. Pri nekem poskusu so ljudem starim nad 65 let dajali dnevno priporočene odmerke cinka (15 mg) in ugotovili, da je količina hormonov in T-celic v njihovi krvi tako narasla, da je bila primerljiva s količinami, ki jih imajo v krvi zelo mladi ljudje.

Cink tudi vpliva na nastajanje spolnih hormonov (testosterona) in izboljša sposobnost za razmnoževanje (ohranja semenčice žive in gibljive). Tako lahko npr. prostata normalno deluje.

1.3.5.2 Cink in encimi

Cela vrsta encimov vsebuje cink, saj omogoča vezanje substratov na aktivne centre teh encimov. Kot strukturni del molekule se nahaja v 60-tih encimih. Najbolj važni od teh so: karboanhidraza, karbooksianhidraza, alkohol-dehidrogenaza, glutamat-dehidrogenaza,

laktat-dehidrogenaza, glicerol-3-fosfat-dehidrogenaza, malat-dehidrogenaza in alkalne fosfataze. Poleg tega je dokazana njegova vloga aktivatorja še 14 drugih encimov.

Karbonska anhidraza je pomembna pri odkritju cinka kot življenjsko potrebnega elementa. Uporabljamo jo vsi višje razviti organizmi, njena naloga pa je, da kisli CO₂ zveže v bazični bikarbonat in ga v pljučih ponovno razveže, da ga lahko izdahnemo. Tako ohranjamo alkalni pH krvi, obenem pa dihamo zadosti hitro, saj bi brez delovanja KA reakcija potekala kar milijonkrat počasneje, potrebovali pa bi pH krvi kar 10.

Za razgradnjo alkohola je potreben encim alkohol-dehidrogenaza, ki je zgrajena okoli cinka, tako da alkohol pospešuje izgubo cinka iz organizma.

Eden najmočnejših antioksidantov je superoksid dismutaza, ki potrebuje za delovanje poleg bakra tudi cink. Če ta reaktivnih kisikovih atomov izgubi atom cinka, postane eden najmočnejših živčnih strupov in ga povezujejo s hudimi okvarami živčevja, poznanimi kot Lou- Gehrigova bolezen. Antioksidacijska vrednost cinka pa se ne konča pri tem encimu. Dokazali so, da cink s svojo vezavo na proteine preprečuje njihovo oksidacijo.

1.3.5.3 Cink in DNA

Cink ima v organizmu pomembno strukturno vlogo, saj nam daje obliko vijačnice DNA, deluje tudi na aktivnost proteinov po imenu transkripcijski faktorji. Cink preko cinkovih prstov igra pomembno vlogo pri regulaciji transkripcije in replikacije DNA. Poleg tega tudi številni mehanizmi za popraviljanje napak DNA vključujejo cink. Primer je tumorsupresorski protein p53, ki sodeluje v celičnem ciklusu, apoptozi, popraviljanju DNA, proliferaciji in diferenciaciji, še posebej pogosta pa je njegova mutacija v tumorjih (>50 človeških malignosti). Mutacija največkrat prizadene gen, ki kodira DNA vezavno mesto na p53, kamor pa se poleg tega veže tudi cink. V celicah, kjer je koncentracija cinka manjša od normalne, se sinteza p53 sicer poveča, vendar pa je v tem primeru protein neaktiven oz. se ni sposoben vezati na DNA. Pomanjkanje cinka torej posredno onemogoča transkripcijo specifičnih genov, potrebnih za popravilo poškodovane DNA. Pri popravilu DNA je prisoten še en protein, katerega delovanje je odvisno od cinka. To je apirimidinska endonukleaza (APE) ali Ref-1. Encim popravlja napake, nastale zaradi alkilacije oz. oksidacije. Te nastanejo zaradi zmanjšane količine cinka, ki pa hkrati poveča sintezo APE.

1.3.6 Klinični znaki

1.3.6.1 Povečana koncentracija cinka (Hipercinkemija)

Presežek cinka se le redko pojavi zaradi povečanega vnosa cinka (več kot 200 mg – akutna zastrupitev s cinkom), v primeru, da je zaradi prevelikega vnosa povečana koncentracija cinka, se pojavijo slabost, bruhanje, driska in želodčne bolečine. Drugi znaki se kažejo kot dehidracija, letargija (duševna otopelost), anemija.

Dolgotrajno vnašanje večje količine cinka v telo lahko privede do zmanjšane koncentracije bakra v organizmu (dnevni vnos več kot 25 mg cinka). Dolgotrajno vnašanje cinka v telo nad 150 mg na dan lahko povzroči zmanjšano delovanje imunskega sistema in zmanjšan nivo HDL holesterola, ki povzroča bolezni srca. V nosečnosti je povišana koncentracija cinka lahko škodljiva za plod (fetus). Povečana koncentracija se kaže tudi kot hipertenzija, eozinofilija (povečanje števila eozinofilcev, vrste belih krvničk), multipli mielom (rak celic krvne plazme) in megaloblastična anemija (je vrsta makrocitne anemije – povečano število makrocitov v krvi, ki je posledica zavrte sinteze DNA v rdečih krvničkah).

Do povišane koncentracije cinka v telesu lahko pride pri zastrupitvi s cinkovimi solmi in pri naslednjih boleznih:

- primarni osteosarkom,
- koronarna srčna bolezen in
- ateroskleroza.

1.3.6.2 Zmanjšana koncentracija cinka (Hipocinkemija)

Do pomanjkanja cinka najpogosteje pride zaradi neustrezne prehrane, nezadostnega vnosa cinka v telo, večje izgube cinka iz telesa (povečano izločanje), zaradi povečane potrebe po cinku ter malabsorpcije (zmanjšano vsrkavanje).

Nevarnost za pomanjkanje cinka je povečana pri bolnikih s prirojeno boleznijo jeter, cirozo, ponavljajočimi se okužbami, anoreksijo in pri alkoholikih ter vegetarijancih. Do pomanjkanja lahko pride tudi pri bolnikih z obolenjem prebavil (Crohnova bolezen - bolezen črevesa) in vnetjem debelega črevesa (ulcerozni kolitis), pri prebavnih motnjah in

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

bolnikov s kronično drisko - vodi do čezmerne izgube cinka. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo (ki je slabo nadzorovana), se manj cinka absorbira, več pa se ga izgublja s sečem.

Znižane koncentracije cinka se pojavijo pri boleznih, kot so:

- tuberkuloza,
- metastatski karcinomi jeter,
- akutne infekcije,
- ciroza jeter,
- akutni infarkt miokarda in
- trebušni tifus.

Veliko znanega o pomanjkanju cinka je pridobljeno iz študije o posameznikih rojenih z enteropatskim akrodermatitisom (genetska motnja, ki je posledica okvarjenega privzema in transporta cinka). Preden je bil znan vzrok za enteropatski akrodermatitis, so bolniki običajno umrli kmalu po rojstvu. Terapija s cinkom popolnoma ublaži simptome, vendar jo je potrebno izvajati celo življenje pri posameznikih z genetsko motnjo.

Pri otrocih so prvi znaki upočasnjena rast, izguba teka, okvara okusa in nizka vsebnost cinka v laseh.

Znaki pomanjkanja cinka so:

- utrujenost,
- izguba teka, zmanjšan apetit (okvara v zaznavanju okusa),
- izpadanje las,
- zaostanek v rasti skeleta,
- vnetje kože,
- značilni kožni izpuščaji,
- kronične in hude driske,
- oteklina,
- nočna slepota,
- povečana jetra in vranica,
- atrofija testisov (zmanjšanje obsega testisov zaradi zmanjšanja celic),
- zmanjšana odpornost proti okužbam,
- slabše celjenje ran ter
- oslabitev ali nesposobnost imunskega sistema.

1.3.6.3 Pomanjkanje cinka in oksidativni stres

Oksidativni stres je definiran kot moteno ravnotežje med nastajanjem reaktivnih kisikovih spojin oz. prostih radikalov in delovanjem antioksidantov, ki oksidante nevtralizirajo [15]. V bioloških sistemih se pokaže potem ko je bil sistem dalj časa podvržen oksidantom, ali je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma (premajhen vnos antioksidantov, nezdravo življenje - kajenje, uživanje drog, pitje alkohola), ki bi varovali in popravljali poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali. Posledica povečanega oksidativnega stresa je povečana vsebnost prostih radikalov v tkivih in celicah.

Pomanjkanje cinka vodi v napredovanje oksidativnega stresa, s tem se poveča možnost za razvoj raka. Dokazano je, da oksidativni stres vpliva na številne kronične degenerativne bolezni, kamor sodi tudi rak.

➤ Funkcija cinka kot antioksidanta:

Cink je glavna komponenta CuZn SOD. Superoksid dismutaza predstavlja glavno obrambo celice pred reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS), ker odstranjuje superoksidne anione (O_2^-).

Cink kot antioksidant preprečuje tudi oksidacijo tiolnih skupin v proteinih. Primer je encim δ -aminolevulinat dehidrataza, ki v primeru odsotnosti cinka postane neaktiven. Podobno so od cinka odvisni tudi tubulin, cinkovi prsti, alanil tRNA sintetaze.

Naslednji mehanizem, kjer cink sodeluje kot antioksidant, je uravnavanje metabolizma metalotioneina (protein, ki odstranjuje hidroksilne radikale). Cink sproži sintezo proteina, s tem pa posredno omogoči obrambo celice pred oksidativnim stresom.

➤ Funkcija cinka kot antagonista:

Druga pomembna funkcija je prisotnost cinka kot antagonista pri oksidaciji kovin (železo, baker), s čimer preprečuje tvorbo hidroksilnih radikalov. Reakcije s kisikom, superoksidom ali vodikovim peroksidom večine biomolekul direktno ne morejo poškodovati, medtem ko jih hidroksilni radikali ($OH\bullet$) lahko oksidirajo. Te spojine nastanejo s prenosom elektrona na H_2O_2 .

Reakcija: $e^- + H_2O_2 \rightarrow OH\bullet + OH^-$

Vodikovemu peroksidu elektron lahko oddajo prehodne kovine (železo, baker) preko Fentonove reakcije:



S tekmovanjem za vezavna mesta za železo in baker lahko cink zmanjša njihovo zmožnost za prenos elektronov oz. zmožnost izvajanja Fentonove reakcije.

1.3.6.4 Pomanjkanje cinka in povečana občutljivost na oksidacijo

Nastajanje ROS je prisotno ves čas med celičnim metabolizmom. V primeru različnih oblik stresa (npr. pomanjkanja hrane) pa se tvorba teh spojin poveča preko dovoljene meje. Številne raziskave so pokazale, da pomanjkanje cinka poveča produkcijo prostih radikalov in s tem občutljivost celice na oksidativne poškodbe. Dodajanje cinka ima torej pozitiven učinek na obrambo pred oksidativnimi poškodbami in napredovanjem bolezni, povzročenih zaradi delovanja ROS. Tako dodajanje cinka npr. varuje pred diabetesom I, poškodbami DNA zaradi vpliva UV žarkov in pred apoptozo. Pri ljudeh terapija s cinkom zavira tudi napredovanje anetodermije (lisasta atrofija kože).

1.3.6.5 Pomanjkanje cinka, celično signaliziranje in apoptoza

Redoks občutljivi transkripcijski faktorji (npr. AP-1, NFκB) ~~mo~~ vplivajo na uravnavanje jakosti oksidativnega stresa, proliferacijo in apoptozo. Tako kot vsi prejšnji so tudi ti proteini odvisni od koncentracije cinka v celici; v primeru pomanjkanja se sposobnost vezave proteinov zmanjša, s tem pa se seveda zmanjša tudi zmožnost popravila poškodovane DNA. Če pa je oksidativni stres za celico premočan, ta doživi nepopravljive napake. DNA se fragmentira, zaradi česar celica vstopi v apoptozo in odmre.

1.3.6.6 Vpliv pomanjkanja cinka na razvoj raka

Rak je bolezen, ki se kaže v nekontroliranem razmnoževanju celic. Vzrok je v spremenjenem genomu [20]. Različni geni, ki so odgovorni za regulacijo celične delitve in jih s skupnim imenom imenujemo protoonkogeni, se z mutacijo tako spremenijo, da delitev celic ni več nadzorovana. Tako spremenjene gene imenujemo onkogene.

Vloga cinka pri razvoju rakavih obolenj je v zadnjih letih doživela veliko zanimanje. Ugotovili so, da njegovo pomanjkanje vpliva na nastanek tumorjev v požiralniku, testisih, ogroža hormonsko funkcijo pri moških, koncentracija celičnega cinka pa močno deluje tudi na stanje prostate. Prostata izmed vseh tkiv vsebuje največjo koncentracijo cinka, zato je še toliko bolj občutljiva na spremembe v njegovi koncentraciji. Uživanje cinka v velikih količinah (>100 mg/dan, normalno 40 mg/dan) ali na daljši rok (>10 let) tako poveča nevarnost za rak. Med samo boleznijo pa se količina cinka zmanjša, zato je potrebno pacientu cink dodajati.

1.3.6.7 Posamezniki, ki jim grozi pomanjkanje cinka [16]:

- dojenčki in otroci,
- nosečnice in doječe ženske, zlasti najstnice,
- bolniki, ki prejemajo parenteralno prehrano (intravensko hranjenje),
- podhranjeni posamezniki, vključno s tistimi z beljakovinsko-energetsko podhranjenostjo in z nervozno anoreksijo,
- posamezniki s hudo ali trdovratno drisko,
- posamezniki z malabsorpcijskim sindromom, vključno s celiakijo in sindromom kratkega črevesa,
- posamezniki z vnetnimi boleznimi črevesa, vključno s Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom,
- posamezniki z alkoholno jetrno boleznijo, ki izločajo večje količine cinka z urinom in imajo nizko raven cinka v jetrih,
- posamezniki s srpasto celično anemijo,
- starejši odrasli (65 let in starejši) in
- strogi vegetarijanci.

1.3.7 Interakcije med nekaterimi pomembnimi hranili

Interakcije cinka z drugimi elementi so bile proučene v številnih študijah. Interakcije potekajo tako v zemlji, rastlinah kot tudi v človeškem organizmu [22].

1.3.7.1 Baker

Ob vnosu velikih količin cinka v telo (50 mg/dan ali več) v obdobju nekaj tednov lahko vpliva na biološko uporabnost bakra. Zmanjšana biološka uporabnost bakra pa lahko privede do slabokrvnosti. Visok vnos cinka povzroča črevesno sintezo na baker vezanega proteina imenovanega metalotionein. Metalotionein ujame baker v črevesne celice in preprečuje njegovo sistemsko absorpcijo. Normalen vnos cinka ne vpliva na absorpcijo bakra in visoka količina vnesenega bakra ne vpliva na absorpcijo cinka [22].

1.3.7.2 Železo

Dopolnilne (38-65 mg/dan elementarno železo) ne pa normalne prehranske vrednosti železa lahko zmanjšajo absorpcijo cinka. Ta interakcija se nanaša na uporabljanje železovih dodatkov v obdobju nosečnosti in laktacije [22], zato so strokovnjaki predlagali tudi uporabo nadomestkov cinka za noseče in doječe ženske, ki zaužijejo več kot 60 mg/dan elementarnega železa.

1.3.7.3 Kalcij

Kalcij (Ca) je svetlo siva alkalijska zemeljska kovina. Kalcij je peti najpomembnejši element v zemeljski skorji. Je najbolj zastopan mineral v organizmu in je glavna sestavina kosti in zob. Nekaj ga je tudi v krvi, mišicah in zunajcelični tekočini. Je najpomembnejši gradnik kosti in zob. Potreben je za normalno krčenje in sprostitvev prečno progastih in gladkih mišic, sodeluje pri uravnavanju prepustnosti celičnih membran in prevajanju živčnih impulzov in v procesu strjevanja krvi ter vpliva na normalni ritem srca in sodeluje kot aktivator v številnih encimskih reakcijah. Najdemo ga v mleku in mlečnih izdelkih, nahaja pa se tudi v mesu, sadju in zelenjavi. Pomanjkanje kalcija je eden glavnih vzrokov za osteoporozo (bolezen, pri kateri postanejo kosti zelo krhke, posledica so pogostejši zlomi kosti). Do pomanjkanja kalcija pride zaradi hormonskega neravnovesja, ob pomanjkanju vitamina D, zaradi motenj absorpcije in pri premajhnem vnosu. Zmanjšana koncentracija kalcija v zunajcelični tekočini povzroči mravljinčenje, krče mišic, moten ritem srca in izgubo apetita.

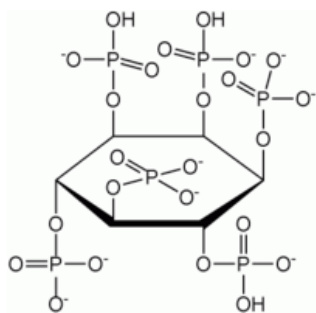
Priporočljiv vnos kalcija je 1000 mg/dan. Kalcij je treba jemati skupaj z magnezijem v razmerju 2:1.

Visoka raven kalcija v prehrani poslabša absorpcijo cinka pri živalih, vendar se ne ve, ali se to pojavi tudi pri človeku. Neka študija je pokazala, da povečanje vnosa kalcija v obliki mleka ali kalcijevega fosfata (skupni vnos kalcija, 1360 mg/dan), pri ženskah v postmenopavzi zmanjša absorpcijo in ravnotežje cinka. Povečanje vnosa kalcija v obliki kalcijevega citrata malata (skupni vnos kalcija, 1667 mg/dan) pri dekletih v mladostni dobi pa ni vplivalo na absorpcijo cinka ali na cinkovo ravnotežje.

Dokazano pa je, da kalcij v kombinaciji s fitinsko kislino zmanjša absorpcijo cinka. Ta učinek je zlasti pomemben za posameznike, ki zelo pogosto uživajo tortilje pripravljene z apnom (npr. kalcijevega oksida) [22].

1.3.7.4 Fitinska kislina

Slika 2: Fitinska kislina[23].



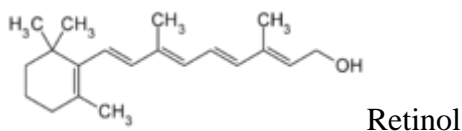
Fitinska kislina (tudi fitična kislina, inozitoln heksakisfosfat (IP6); fitat, če je v obliki soli) je v mnogih rastlinskih tkivih poglavitna zaloga fosforja, zlasti v semenu.

Fitinska kislina ima številne raznovrstne učinke na človekovo zdravje, pri čemer gre predvsem za antioksidativno in antikancerogeno (varuje pred rakom) ter hiperholesterolemično (znižuje nivo holesterola) in hipolipemično (znižuje raven lipidov v krvi) delovanje.

Obstajajo domneve, da fitinska kislina zmanjšuje ali preprečuje absorpcijo določenih mineralov in elementov v sledovih. Pri tem naj bi šlo predvsem za slabšo absorpcijo kalcija, magnezija in cinka. V tej smeri so bile izvedene študije, pri katerih so opazovali absorpcijo navedenih kationov. Ugotovljen je bil močno negativen učinek fitinske kisline na absorpcijo cinka, pri čemer sta bila za to odgovorna inozitol heksafosfat in inozitol pentafosfat in ne nižje fosforilirani derivati [23].

1.3.7.5 Vitamin A

Slika 3: Vitamin A [24].



Vitamin A je v maščobah topen vitamin, večina vitamina A se nalaga v jetrih. Poznamo dve obliki vitamina A: ena oblika je retinol, ki je sestavni del živčnih receptorjev, ki so občutljivi na svetlobo in ga najdemo v očesni mrežnici; druga oblika pa je retinojska kislina, ki omogoča zdravo kožo ter sluznico dihal, črevesja in sečil. Prvi simptom pomanjkanja vitamina A je nočna slepota, pojavi se zaradi nezmožnosti obnove rodopsina, nadaljnje očesne spremembe imenujemo kseroftalmija, kar pomeni izsušitev oči. Na koncu pride še do erozije in zmeščanja roženice, kar lahko povzroči trajno slepoto. Pomanjkanje vitamina A povzroči vnetje kože, poveča se dovzetnost za različne okužbe [24]. Poznamo akutno (prevelik odmerek zaužit naenkrat) in kronično (uživanje prevelikih odmerkov traja dalj časa) bolezen zaradi prevelikega vnosa vitamina A v telo. Simptomi prevelikih vnosov vitamina A v telo so: izpadanje las in obrvi, razpokane ustnice, suha in hrapava koža, kasneje pa se pojavijo še glavobol, pritisk v glavi, šibkost, povečajo se jetra in vranica.

Priporočljiv vnos vitamina A je 800 μ g/dan.

Cink in vitamina A medsebojno vplivata na več načinov. Cink je sestavni del retinol vezavnega proteina, gre za beljakovine potrebne za transport vitamina A po krvi. Cink je potreben tudi za encim, ki pretvarja retinol (vitamina A) v retinal. Ta zadnja oblika vitamina A je potrebna za sintezo rodopsina, proteina v očesu, ki absorbira svetlobo in tako sodeluje v prilagajanju na svetlobo in temo. Pomanjkanje cinka je povezano z zmanjšanim sproščanjem vitamina A iz jeter, kar lahko prispeva k simptomu nočne slepote [22].

1.3.8 Viri cinka

1.3.8.1 Cink v hrani

Kakovost naravnih virov cinka je odvisna od količine in razpoložljivosti cinka v določenem živilu. Najkakovostnejši viri so meso (predvsem rdeče meso), morske školjke in jajca, saj vsebujejo veliko cinka in aminokislin, ki izboljšujejo absorpcijo (metionin in

cistein) in ne vsebujejo snovi, ki bi absorpcijo zavirale. Razpoložljivost cinka iz rastlinskih virov je manjša, saj vsebujejo relativno veliko fitinske kisline, ki zavira absorpcijo cinka. Razpoložljivost cinka v kvašenih živilih je večja, saj kvas oz. njegove encimske reakcije zmanjšujejo količino fitinske kisline.

Naravni vir cinka so:

- morski sadeži, govedina, svinjina, puranje meso,
- kvas, pivski kvas,
- ribe, tunina,
- jajca, sir,
- žita (moka, žitni kalčki in polnozrnate žitarice),
- rastlinska hrana (soja, otrobi, neoluščen riž, bučna semena in oreščki) ter sladkor .

Tabela 3: Količina cinka v posameznem živilu [12].

| Živilo | Cink (mg/100g) |
|-------------------|-----------------------|
| Školjke | 20 |
| Meso, rdeče | 4,4 – 8,5 |
| Parmezan | 4 |
| Jajce (rumenjaki) | 3,8 |
| Ameriški lešniki | 3,3 |
| Orehi | 2,5 |
| Piščanec | 1,6 - 2,8 |
| Lešniki | 1,87 |
| Polnozrnati kruh | 1,3 |
| Jajce (celo) | 1,3 |
| Mleko | 0,5 |

Nedavno je bilo potrjeno, da so bučna semena, katerih izvor je SV del Slovenije bogat vir cinka (91,2 µg/g). Bučna semena priporoča tudi Svetovna zdravstvena organizacija kot pomembno komponento in kot enega izmed najbolj koncentriranih virov cinka v

vegetarijanski prehrani. Tudi zelena solata kristalka vsebuje kar velik delež cinka (36,7 µg/g) in za razliko od bučnih semen, večji del solate predstavlja voda (okoli 95 %).

1.3.8.2 Dodatki cinka

Kot prehranski dodatek je cink na voljo v različnih oblikah (cinkov pikolinat, cinkov sulfat, cinkov acetat, cinkov glukonat, cinkov oksid...), ki se razlikujejo glede na absorpcijo.

Cinkov glukonat in cinkov acetat se uporabljata v oblikah pastil ali tablet za zmanjšanje simptomov prehlada.

Cinkov laktat se nahaja v zobni pasti, pomemben pa je za preprečevanje zadaha iz ust.

Cinkov pirition se uporablja v šamponih za lase, zaradi preprečevanja nastanka prhljaja.

Cinkov oksid se zelo pogosto uporabljamo v farmaciji, ker dobro prekriva kožo v obliki past in posipov. Skozi kožo in predvsem lasne mešičke ter znojnice penetrira (se postopno širi na druga področja) v telo (odvisno od pH). Ionizira v obliki ustreznih maščobnih kislin na koži. Deluje kot blagi adstrigens (farm. snov, ki zožuje površinske krvne žilice) in antiseptik, vendar kože ne poškoduje. Je tipična zdravilna učinkovina pri zdravljenju kožnih bolezni in vnetjih.

ZMA pomeni pravzaprav kratico za cink metionin aspartat. ZMA poleg cink metionin aspartata vsebuje še cink aspartat, magnezijev aspartat ter vitamin B6. ZMA naj bi pozitivno vplival na količino prostega testosterona. Povečuje mišično moč in vzdržljivost, zmanjšuje mišične krče in poškodbe ter izboljšuje koncentracijo in budnost.

Preparat ZMA je popularen predvsem med športniki.

1.3.9 Samodiagnostika za pomanjkanje cinka:

Zaradi razporejenosti po telesu in predvsem znotraj celic je laboratorijsko določanje količine telesnega cinka težka in nevhvaležna naloga, zato je dobro poznati samodiagnostiko.

Dokaj zanesljiv je okušalni test, saj je cink prisoten v okušalnih brbončicah. V kozarcu vode je potrebno raztopiti cinkovo sol, bodisi sulfat ali klorid, v majhni količini okoli 10 mg na deciliter. Če ima posameznik zadosti cinka, bo takšna raztopina grenka že ob prvem požirku, če pa mu ga primanjkuje, se okus raztopine ne bo razlikoval od okusa vode.

V drugem primeru posameznik poskuša raztopino požvrkljati v ustih in ko bodo brbončice vsrkale cink, bo kaj kmalu začutil njegovo grenkobo [12].

1.3.10 Cink v tleh

Kovine so v tleh naravno prisotne. Nastajajo s preperevanjem matične podlage in se v tleh pojavljajo v različnih koncentracijah. Kovine v sledovih so tiste, ki se pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah, težke kovine pa tiste med njimi, ki imajo gostoto večjo od 5g/cm^3 . Kovine v sledovih so esencialne, za delovanje metabolizma nujno potrebne, ter neesencialne, ki so v visokih koncentracijah za organizme toksične.

Cink se enakomerno nahaja v vseh kamninah zemeljske skorje. Najpogosteje se cink v tleh pojavlja kot cinkova svetlica ali cinkov sulfid (ZnS).

Zn se v večini talnih tipov kopiči v zgornjih plasteh, kjer se veže adsorpcijsko na glinene minerale in organsko snov [27]. Najbolj pogosta in tudi mobilna oblika so cinkovi ioni Zn^{2+} . V talni raztopini pa se pojavljajo še druge ionske oblike cinka, kjer je cink v vseh strukturah tudi Zn^{2+} : ZnCl^+ , ZnOH^+ , ZnHCO_3^+ , Zn(OH)_2 , ZnO , ZnCO_3 , ZnO_2^{2-} .

Cink se v tleh nahaja naravno, njegova povprečna koncentracija pa je od 10 do 300 $\mu\text{g/g}$ tal [28].

Dostikrat cinka v tleh primanjkuje, ker je vezan na trdno fazo tal, ali pa njegovo dosegljivost za rastline zmanjšujejo antagonistični kalcij, železo, baker in nikelj.

Tla v Sloveniji so v splošnem dokaj neonesnažena s težkimi kovinami v primerjavi z industrijsko bolj razvitimi zahodnimi državami, obstaja pa kar nekaj območij, kjer so koncentracije težkih kovin v tleh povišane. Na območju Celja so tla močno onesnažena z Zn [28]. Na območju Jesenic v bližini železarne so zelo visoke vsebnosti Zn, Ni, Co, Cr, Fe, Mn, Cd in Pb. Zaradi dolgotrajne obremenitve tal in obsežnih padavin so povišane koncentracije teh kovin tudi v globljih plasteh tal. Območje Ljubljane ni močno onesnaženo, vendar je mestna deponija preobremenjena z Zn, s Cu in Pb. Z Zn, s Pb ter s Cd je onesnažena tudi Mežiška dolina [28].

2 NAMEN DELA

Cink spada med esencialne oligoelemente in v našem telesu deluje kot nekakšen prometnik, ki usmerja in nadzoruje potek dogajanj v telesu ter stanje encimskega sistema in celic. Za pozitivne funkcije cinka v telesu je ključnega pomena njegova optimalna prisotnost v organizmu. Prenizek ali previsok vnos cinka v organizem zniža njegovo biološko vlogo v organizmu. Na vnos cinka v organizem vpliva več različnih faktorjev (prehrana, okolje, voda...).

V okviru EU projekta smo v Sloveniji na različnih področjih (v Ljubljani-Višmarje Brod, Idriji in Žužemberku) vzeli 173 vzorcev krvi in urina otrokom starim od 8 do 11 let. Tem vzorcem smo določali koncentracijo cinka v plazmi v $\mu\text{mol/L}$.

V diplomski nalogi bomo statistično ovrednotili rezultate meritev koncentracije cinka v krvi z namenom da ugotovimo:

- Ali se koncentracija cinka v plazmi razlikuje glede na lokacijo, kjer živimo?
- Ali so prebivalci v urbanem okolju preobremenjeni z težkimi kovinami?
- Kakšen vpliv ima rudnik na vsebnost cinka prebivalcev Idrije in kakšna je vsebnost cinka prebivalcev v mestu?

3 MATERIALI IN METODE

3.3 BIOLOŠKI VZORCI

Koncentracijo cinka določamo v različnih bioloških vzorcih: serum, urin, lasje, eritrociti, blato, ejakulat in likvor.

Za odvzem krvi uporabljamo kemično čist pribor, brez sledov cinka, zaščiten pred zunanjo kontaminacijo. Vzorec odvezamemo v vacutainerske epruvete, namenjene za določanje elementov v sledovih (npr. Becton-Dickinson 7 ml, št. 367737). Vzorec je potrebno čim prej dostaviti v laboratorij. Če to ni možno, ga je potrebno centrifugirati in serum odliti v kemično čiste polipropilenske epruvete z zamaškom. Tako pripravljen vzorec se lahko hrani v hladilniku največ 24 ur. Vzorec lahko zamrznemo na -20 °C in ga shranimo do analize.

Mi smo analizirali rezultate koncentracij cinka, ki smo jih dobili iz 173-ih vzorcev krvi pri otrocih starih od 7 do 11 let. Otroke smo razdelili v tri skupine glede na to, v kakšnem življenjskem okolju živijo. Otroke iz osnovne šole Vižmarje Brod smo uvrstili v skupino otrok živečih v mestnem okolju, otroke iz Žužemberka smo uvrstili v skupino iz kmečkega okolja, otroke iz osnovne šole Idrija pa v skupino otrok iz obremenjenega okolja.

Znotraj teh treh skupin smo razdelili otroke še po spolu.

3.4 REAGENTI

Vsi delovni reagenti morajo biti visoke stopnje čistosti (suprapur quality).

Diluent: raztopina 0,1 mol/L HNO₃ (7ml 65 % HNO₃ na 1L H₂O)

Standard: Tritisol Zinc standard 9953 (Merck, Darmstadt)

Kontrola: Seronorm Trace Elements Serum 1 (SERO AS Asker-Norway)

Voda: Laboratorijska voda (deionizirana z reverzno osmozo)

3.5 OPREMA

Za delo smo potrebovali primerno delovno okolje in laboratorijski pribor. Med laboratorijski pribor štejemo: primerne pipete s plastičnimi nastavki, polipropilenske epruvete, plastične stekleničke za reagente in deionizirano vodo.

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

Pred uporabo preverimo čistost laboratorijskega pribora, ki ga za analizo uporabljamo. Čez noč ga namočimo v 4 % HNO_3 (ultrapure). Če je potrebno, namakalno raztopino analiziramo na vsebnost cinka, ki mora biti na meji detekcije ali pod njo (meja detekcije-najnižja koncentracija analita, ki jo lahko z določeno gotovostjo zaznamo z določeno metodo, Varian: $1,6 \mu\text{g/L}$). Uporabljamo s kislino pomit laboratorijski pribor oz. pribor za enkratno uporabo iz polipropilena.

3.6 INSTRUMENT

Za analizo smo uporabili atomski absorpcijski spektrofotometer znamke Varian SpektrAA-250Plus Flame atomic absorption spektrometer (Varian Australia Pty Ltd Mulgrave, Victoria, Australia). Instrument Spektraa-250 Plus mora biti nameščen v čisti sobi s filtriranim zrakom (brez prahu – razred 100). Aparat se nahaja v Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani.

Slika 4: Atomski absorpcijski spektrofotometer



3.7 KALIBRACIJA (UMERJANJE APARATA)

Za kalibracijo uporabljamo Merckov vodni standard različnih koncentracij. Kalibracija je umeritev analiznega sistema (instrument, reagenti...), ki v določenih pogojih postavi razmerje med vrednostmi merilnega sistema ali referenčnim materialom in pripadajočim vrednostim, realiziranimi z etaloni (VIM 1993) [33]. Kalibriramo po servisu, po zamenjavi kemijskih parametrov, po zamenjavi lot. številke

kalibratorja, reagenta ali kontrolnega materiala, po neuspešni kalibraciji in po neuspešni analizi kontrolnega materiala.

Kontrolni material je material z določenimi koncentracijskimi mejami, uporabljamo pa ga za kontrolo stabilnosti analitskega procesa. Analizo kontrolnega materiala izvajamo pred začetkom dela, med delom (za vsakim desetim vzorcem) in po končanem delu oz. po potrebi (po servisu, po zamenjavi kemijskih parametrov, po zamenjavi reagenta ali kontrolnega materiala, po neuspešni kalibraciji in po neuspešni analizi kontrolnega materiala).

3.8 METODE DOLOČANJA CINKA

Pri določanju cinka imamo velik problem, saj je zelo razširjen v okolju in lahko pride do kontaminacije biološkega materiala, v katerem določamo cink, reagentov in pribora, ki ga bomo uporabljali pri določeni metodi. Zato je potrebno paziti na čistočo stekla, vode, kemikalij, posebno pozornost moramo nameniti tudi iglam za odvzem krvi, posodam za odvzem urina, sline. Laboratorijski pribor je potrebno čistiti in prati kot za določanje bakra in železa. Vodo moramo redestilirati iz steklenega aparata in tudi vse kemikalije po analizi. Za določanje koncentracije cinka se uporabljajo različne metode, najpogosteje se uporablja metoda atomske absorpcijske spektrofotometrije, tudi mi smo uporabili to metodo.

Metode morajo biti občutljive (pomeni sposobnost metode, da se že na majhno spremembo v koncentraciji odzove z velikim signalom), specifične (pomeni, da je neka metoda sposobna v zmesi kemijsko podobnih snovi izmeriti samo koncentracijo našega analita), natančne (nam pove, kakšno je sipanje meritev okoli prave vrednosti), točne (nam pove, kako blizu prave vrednosti je povprečje meritev) in razmeroma hitre.

3.8.7 Atomska absorpcijska spektrofotometrija

Pojav atomske absorpcije (AA) so prvič opazili leta 1802 z odkritjem linij Fraunhofer v sončevem spektru. Leta 1953 je avstralski fizik Sir Alan Walsh dokazal, da se atomska absorpcijska spektroskopija lahko uporabi kot kvantitativna analitska metoda.

Slika 5: Sir Alan Wals [34]



AAS je metoda za elementarno analizo vzorcev. Je zelo občutljiva in z njo lahko določimo 67 različnih elementov.

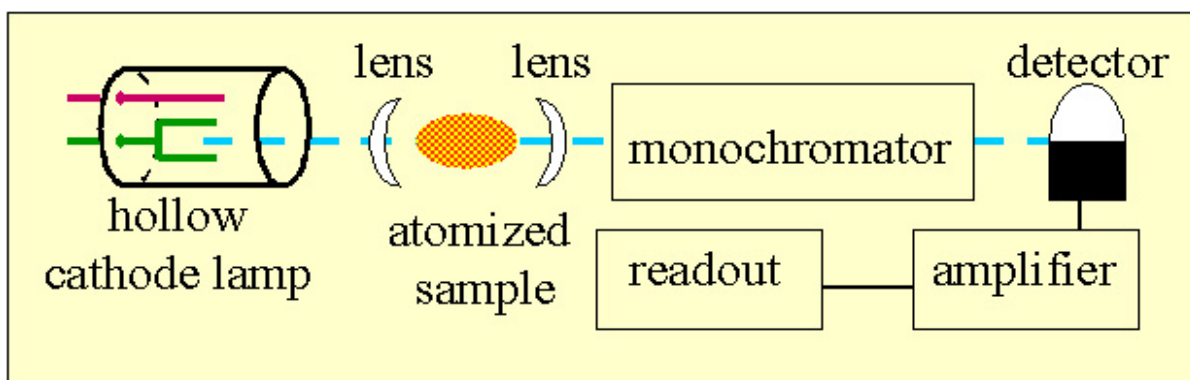
Poznamo dve vrsti atomske absorpcijske spektrofotometrije:

- plamensko AAS, kjer določamo koncentracijo v območju nekaj mg/L ali manj,
- elektrotermično AAS, kjer določamo koncentracijo v območju nekaj $\mu\text{g/L}$ ali manj.

Pri atomski absorpcijski metodi gre za merjenje količine energije v obliki fotonov svetlobe, ki jo vzorec absorbira.

Vsak atom ima določene vzorce valovnih dolžin, pri katerih absorbira energijo, zaradi edinstvene konfiguracije elektronov v zunanji lupini. To omogoča kakovostne analize čistega vzorca.

Slika 6: Shematski prikaz atomske absorpcije [34]



Atomska-absorpcijska (AA) spektroskopija uporablja absorpcijo svetlobe za merjenje koncentracij atomov v plinski fazi. Ker so vzorci večinoma tekočine ali trdne snovi, morajo atomi ali ioni analita izpareti v plamenu ali grafitni peči - atomizacija. Atomi absorbirajo ultravijolično in vidno svetlobo in preidejo v višje ravni elektronske energije. Koncentracija analita se določi s količino absorpcije. Povezavo med absorbanco in koncentracijo vzorca nam podaja Beer-Lambertov zakon.

Beer-Lambertov zakon [25]:

$$\log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \varepsilon \times c \times l = A$$

I_0 ... intenziteta vstopnega žarka

I_t ... intenziteta prepuščenega žarka

ε ... molarna absorptivnost [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

c ... koncentracija [mol L^{-1}]

l ... dolžina kivete [cm]

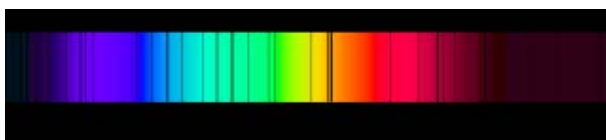
A ... absorbanca ali optična gostota spojine [nima enot]

Ta metoda omogoča tako občutljivost kot selektivnost, saj drugi elementi v vzorcu ponavadi ne absorbirajo izbrane valovne dolžine in s tem ne ovirajo meritve. Da bi zmanjšali motnje v ozadju, je valovna dolžina, ki jo želimo izmeriti, izolirana z monokromatorjem (Czerny-Turner) nameščenim med vzorcem in detektorjem.

Meritvi koncentracij se ponavadi določi kalibracijska krivulja, izdelana pa jo analitik s standardi znane koncentracije.

V našem primeru smo za atomizacijo uporabljali za plamen acetilen-zrak, za izvor svetlobe pa smo uporabili votlo katodo (Zn).

Slika 7: Absorpcijski spekter [34]



3.8.7.1 Glavne komponente spektrometra

Tipični spektrometer ima šest osnovnih komponent v eni ali dvojni svetlobni konfiguraciji.

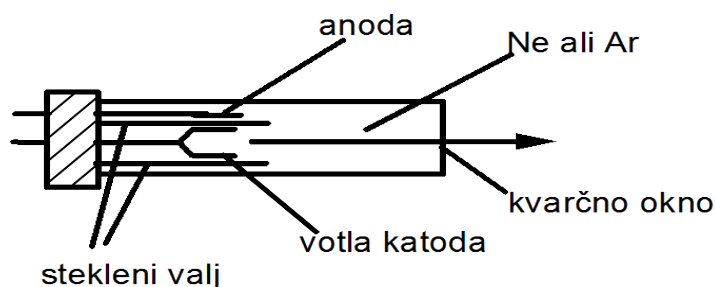
Šest komponent vključuje:

1. Vir svetlobe; običajno je to votla katoda, ki seva svetlobo točno določene valovne dolžine [25].

➤ Žarnica z votlo katodo:

Je najpogostejši vir sevanja v AAS. Znotraj svetilke, ki je napolnjena s plinom, argonom ali neonom, je katoda, ki vsebuje kovino za vzbujanje in anoda. Pri visoki napetosti med anodo in katodo se ionizirajo delci plina. Ko se napetost dovolj poveča, pridobijo plinski delci dovolj energije, da izbijejo kovinske atome iz katode in s tem nastane oblak atomov. Iztirjeni kovinski atomi z medsebojnimi trki prehajajo v vzbujeno stanje in oddajo svetlobo s frekvenco značilno za kovino. Žarnice z votlo katodo so selektivne za različne kovine.

Slika 8: Žarnica z votlo katodo



➤ Ostali izvori sevanja:

Spektralna žarnica, visokofrekvenčna brezelektrodna žarnica, je brez elektrod, energijo pa dobi s pomočjo mikrovalov. Sestavljena je iz kvarčne cevke, ki je zapolnjena z inertnim plinom in izbrano kovino. Intenziteta sevanja tovrstnega izvora je 10-100 krat večja kot pri katodni žarnici; ugotovili so, da je tudi bolj občutljiva, vendar je stabilnost slabša.

Pri atomski absorpcijski spektrometriji se uporablja tudi devterijeva žarnica, ki oddaja enakomerno UV svetlobo.

2. Medij, kjer se tvorijo atomi (ioni). Pri plamenski AAS je to plamen, pri elektrotermični pa grafitna kiveta. Kiveta mora biti iz materiala, ki prepušča sevanje zelene valovne dolžine. Kivete uporabne za UV območje so narejene iz kvarčnega stekla, za VIS področje pa so lahko iz navadnega stekla.
3. Monokromator je optični medij, ki iz vhodnega širokega spektra svetlobe prepusti na izhod zelo ozek frekvenčni pas svetlobe. Monokromator usmeri svetlobne žarke v isto smer, tako da so vzporedni; prostorsko loči svetlobo po valovni dolžini.
4. Detektor je instrument, ki meri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec. Pri tem pretvori svetlobno energijo v električni signal. Za merjenje nizke svetlobne intenzitete uporabljamo fotopomnoževalke, drugače pa se uporabljajo tudi fotodiode.
5. Naprava za obdelovanje rezultatov. Gre za računalnik, ki je povezan s spektrofotometrom in s pomočjo tega računalnika dobimo rezultate. Iz umeritvene krivulje dobimo direktno koncentracijo analita v vzorcu.
6. Sredstvo za prikaz rezultatov: zaslon in tiskalnik.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

Leta 2007 so bile na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani opravljene meritve koncentracije cinka v serumu 173 otrok iz treh različnih osnovnih šol. Učenci osnovnih šol predstavljajo vzorce populacije otrok, ki prihajajo iz mestnega, kmečkega in z živim srebrom obremenjenega okolja.

Z analizo smo pridobili veliko podatkov za vsakega posameznega učenca, zato smo te podatke zbrali in uredili v Microsoft Excelovem dokumentu.

Podatke smo razdelili v tri skupine glede na kraj bivanja (Ljubljana-Vižmarje Brod-mestno okolje, Žužemberk-kmečko okolje in Idrija-obremenjeno okolje), nato pa smo vse tri skupine razdelili še glede na spol.

V Microsoft Excelovem dokumentu smo najprej analizirali število preiskovancev glede na spol in osnovno šolo ter izračunali povprečno koncentracijo cinka v krvi deklic in dečkov iz različnih osnovnih šol.

Za nadaljnjo statistično obdelavo smo podatke vnesli v statistični program SPSS 17,0. Najprej smo opravili Kolmogorov-Smirnov test ter tako testirali normalno porazdelitev koncentracij cinka pri vsaki skupini. S tem testom smo hkrati pridobili podatke o povprečni koncentraciji in standardni deviaciji za vsako skupino otrok. Nato smo omenjeni test izvedli še za vsak spol posebej. Rezultate smo nato prikazali še s histogrami.

Sledila je primerjava in analiza skupinskih rezultatov. Najprej smo opravili Levenejev test in s tem ugotovili homogenost (enakost) varianc med preiskovanimi skupinami. Z enosmernim testom ANOVA smo hoteli dokazati, ali se koncentracije glede na osnovno šolo razlikujejo. S post-hoc analizo smo ugotovili, katere skupine podatkov se med seboj statistično razlikujejo. Tudi za primerjavo med spoloma smo uporabili enake teste. Pri vseh testih smo predpostavili, da je stopnja značilnosti tveganja 0,05.

5 REZULTATI

5.1 REZULTATI PO SKUPINAH

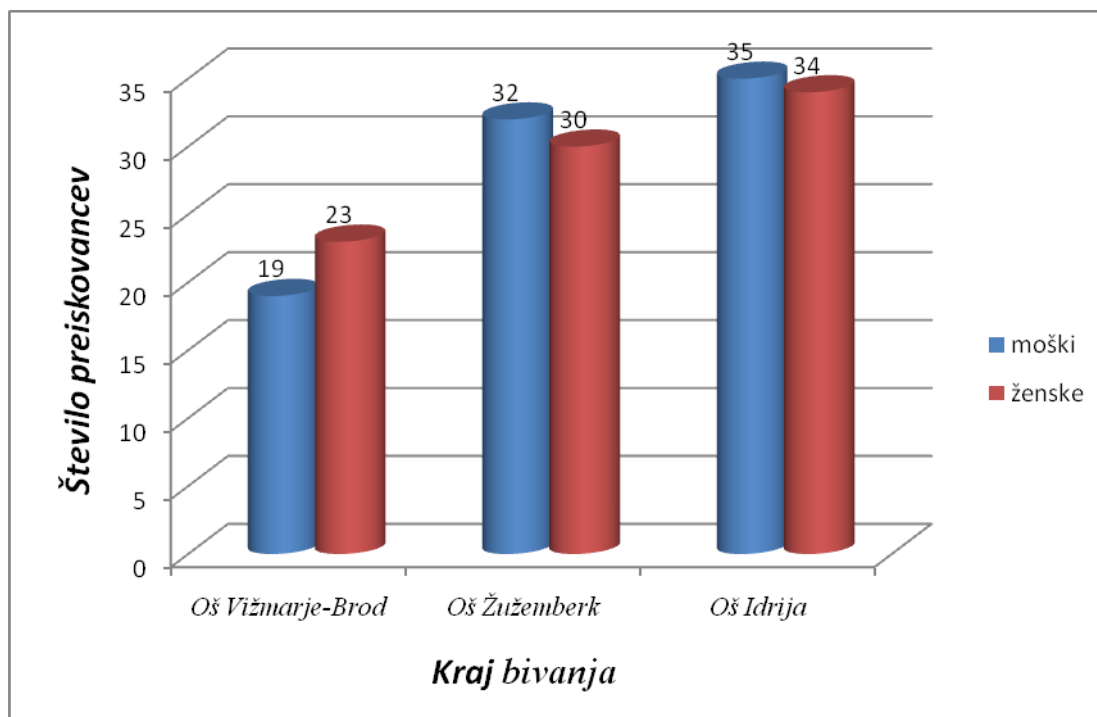
Analiza podatkov je zajemala preiskovancev treh različnih osnovnih šol.

Prvo skupino preiskovancev predstavljajo otroci iz osnovne šole Vižmarje Brod, drugo skupino otroci iz osnovne šole Žužemberk in tretjo skupino otroci iz osnovne šole Idrija.

Število preiskovancev v prvi skupini je bilo 42, od tega 19 dečkov in 23 deklic. V drugi skupini je bilo skupaj 62 preiskovancev, od tega 32 dečkov in 30 deklic, tretjo skupino pa sestavlja 69 preiskovancev, od katerih je 35 dečkov in 34 deklic.

V spodnjem grafu (Slika 9) je prikazano število otrok glede na spol in osnovno šolo.

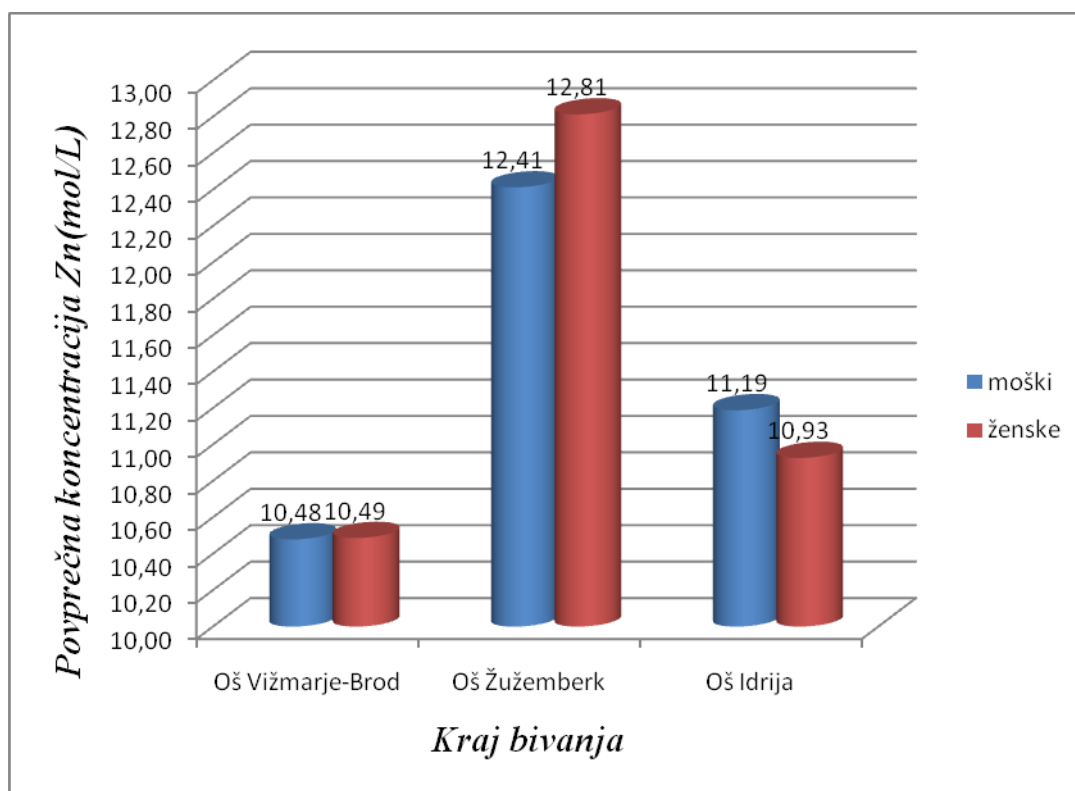
Slika 9: Število preiskovancev glede na spol in osnovno šolo



Največ preiskovancev je bilo iz OŠ Idrija, z nekaj preiskovanci manj sledi OŠ Žužemberk in najmanjša skupina iz OŠ Vižmarje-Brod, z 42 preiskovalci. Skupina iz OŠ Vižmarje-Brod je edina, v kateri je število deklic večje od števila dečkov. V drugih dveh skupinah sta deleža bolj enakomerna, nekoliko večje število je dečkov.

Povprečno koncentracijo cinka v krvi dečkov in deklic, glede na šolo, ki jo obiskujejo, smo prikazali v naslednjem grafu (Slika 10).

Slika 10: Povprečna koncentracija Zn v krvi glede na spol in kraj bivanja



Iz grafa (Slika 10) je razvidno, da povprečna vrednost ne presega mejne vrednosti koncentracije cinka pri preiskovancih iz vseh treh OŠ. V našem primeru je mejna vrednost 10,0-19,7 $\mu\text{mol/L}$.

Povprečna koncentracija otrok iz OŠ Žužemberk je bila najvišja od vseh treh OŠ, pri dečkih je znašala 12,41 $\mu\text{mol/L}$, pri deklicah pa je bila nekoliko višja 12,81 $\mu\text{mol/L}$. Otroci iz OŠ Idrija so imeli malo nižjo povprečno koncentracijo kot otroci iz OŠ Žužemberk. Pri dečkih je znašala 11,19 $\mu\text{mol/L}$, pri deklicah pa 10,93 $\mu\text{mol/L}$, kar je nekoliko manj kot pri dečkih. Najnižjo povprečno koncentracijo Zn so imeli učenci iz OŠ Vižmarje-Brod, pri dečkih je znašala 10,48 $\mu\text{mol/L}$, pri deklicah pa 10,49 $\mu\text{mol/L}$, dečki so imeli nekoliko nižjo povprečno koncentracijo kot deklice. Dečki iz OŠ Vižmarje-Brod so imeli od vseh

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

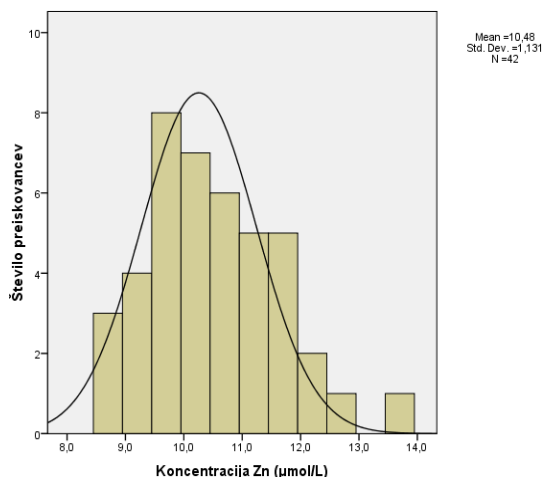
preiskovancev najnižjo povprečno koncentracijo. Nihče od preiskovancev pa ni imel povišane koncentracijo cinka v krvi.

5.1.1 Osnovna Šola Vižmarje-Brod

Prva analizirana skupina otrok predstavlja skupino, ki izhaja iz mestnega okolja ter obiskuje osnovno šolo Vižmarje-Brod. Preiskovano skupino sestavlja skupaj 42 otrok, od tega je 19 dečkov in 23 deklic.

Najprej smo porazdelitev koncentracij cinka v krvi preiskovancev iz OŠ Vižmarje Brod prikazali v spodnjem histogramu. Krivulja nam prikazuje normalne porazdelitve obravnavane skupine z upoštevanjo povprečno vrednostjo in standardno deviacijo.

Histogram 1: Koncentracija Zn-OŠ Vižmarje-Brod



Pri nadaljnji analizi v programu SPSS 17.0 smo najprej napravili Kolmogorov-Smirnov test, s katerim smo ugotavljali, ali so koncentracije cinka v krvi pri preiskovancih normalno porazdeljene.

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

Slika 11: K-S test za OŠ Vižmarje-Brod

| One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test | | | KZn |
|------------------------------------|----------------|--|--------|
| N | | | 42 |
| Normal Parameters ^{a, b} | Mean | | 10,483 |
| | Std. Deviation | | 1,1311 |
| Most Extreme Differences | Absolute | | ,118 |
| | Positive | | ,118 |
| | Negative | | -,057 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | | ,763 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | ,605 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

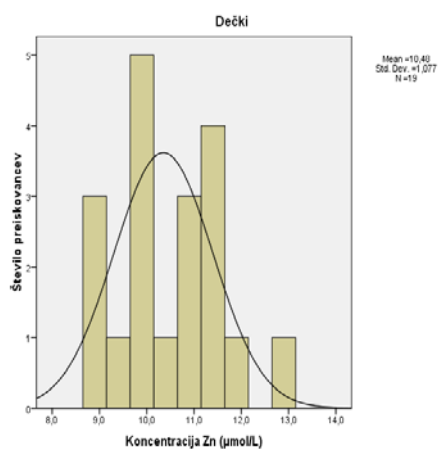
Kolmogorov-Smirnov test (slika 11) nam prikazuje, koliko otrok je v naši preiskovani skupini, prikaže pa nam tudi povprečno koncentracijo cinka, ki je pri naših preiskovancih 10,483 $\mu\text{mol/L}$. Vrednost je v referentnem intervalu za normalno populacijo, ki pa znaša 10,0-19,7 $\mu\text{mol/L}$. Standardna deviacija pa znaša 1,1311 $\mu\text{mol/L}$.

Iz omenjenega testa lahko razberemo tudi največjo pozitivno in negativno razliko porazdelitve koncentracij.

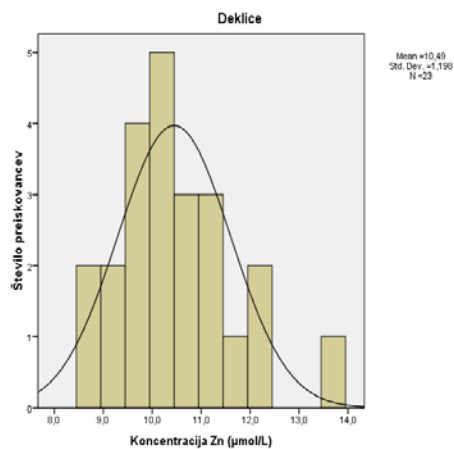
Vse statistične teste smo opravili pri stopnji značilnosti 0,05. Vrednosti koncentracij Zn v plazmi so se porazdelile normalno, saj je stopnja značilnosti 0,605, kar je več kot 0,05.

Podatke o koncentraciji cinka smo razdelili še glede na spol preiskovancev. Porazdelitev koncentracij za različna spola smo prikazali v spodnjih histogramih.

Histogram 2: koncentracija Zn- dečki



Histogram 3: Koncentracija Zn-deklice



Iz zgornjih histogramov je razvidno, da je porazdelitev koncentracije cinka pri deklicah bližje teoretični normalni porazdelitvi, kar je razvidno tudi iz Kolmogorov-Smirnovega testa (slika).

Slika 12: K-S test za dečke in deklice OŠ Vižmarje-Brod

| One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test | | | |
|------------------------------------|----------------|--------|---------|
| | | dečki | deklice |
| N | | 19 | 23 |
| Normal Parameters ^{a, b} | Mean | 10,479 | 10,4870 |
| | Std. Deviation | 1,0768 | 1,19822 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,145 | ,094 |
| | Positive | ,145 | ,094 |
| | Negative | -,120 | -,068 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,634 | ,451 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,816 | ,987 |

a. Test distribution is Normal.

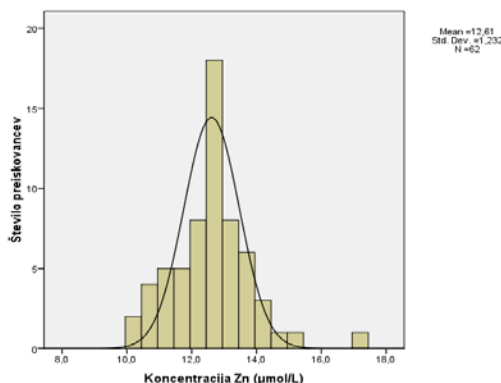
b. Calculated from data.

Iz Kolmogorov-Smirnovega testa je razvidno, da sta porazdelitvi za oba spola normalno porazdeljeni ($p > 0,05$), saj vrednost za dečke znaša 0,816 za deklice pa 0,987. Pri obeh spolih je stopnja značilnosti veliko večja kot pa pred razdelitvijo.

5.1.2 Osnovna šola Žužemberk

Druga skupina otrok obiskuje OŠ Žužemberk in predstavlja skupino preiskovancev iz kmečkega okolja. V spodnjem histogramu je prikazana porazdelitev koncentracije cinka v krvi otrok. Iz njega je razvidno, da so porazdelitve koncentracij normalno porazdeljene glede na teoretično normalno porazdelitev.

Histogram 4: Koncentracija Zn-OŠ Žužemberk.



Slika 13: K-S test za OŠ Žužemberk

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | KZn |
|-----------------------------------|----------------|--------|
| N | | 62 |
| Normal Parameters ^{a, b} | Mean | 12,606 |
| | Std. Deviation | 1,2321 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,086 |
| | Positive | ,086 |
| | Negative | -,079 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,680 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,745 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tudi Kolmogorov-Smirnov test nam pove, da so se vrednost koncentracij Zn v krvi porazdelile normalno ($p > 0,05$), kot je razvidno iz slike 13.

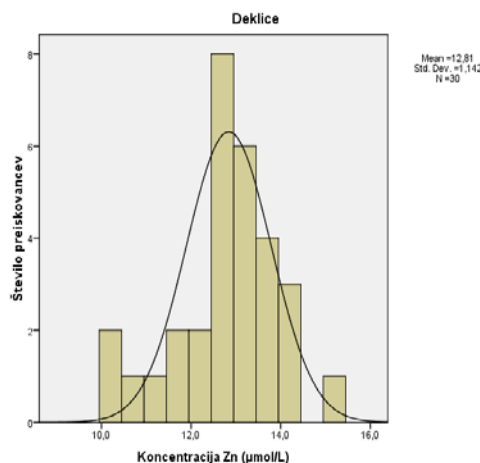
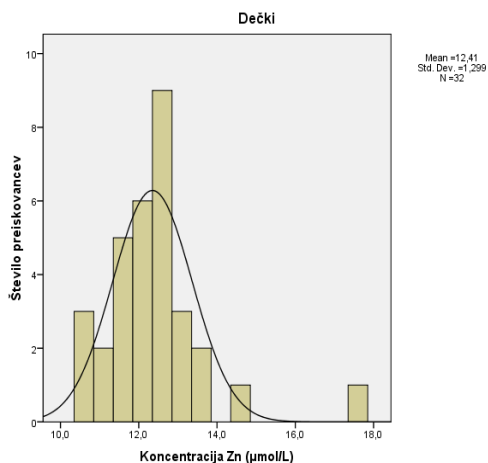
V nadaljevanju smo tudi te podatke o koncentracijo cinka razdelili glede na spol. Izdelali smo histograma in iz njiju je razvidno, da je porazdelitev koncentracij Zn pri deklicah veliko bližje teoretični normalni porazdelitvi. To smo dokazali tudi s Kolmogorov-Smirnovim testom.

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

Histogram 5: Koncentracija Zn-dečki

Histogram 6: Koncentracija Zn-deklice



Vrednost stopnje značilnosti znaša za dečke 0,340, za deklice pa 0,703. Obe vrednosti sta večji od mejne ($p > 0,05$), kar kaže na normalno porazdelitev koncentracije cinka, ne glede na delitev vzorcev.

Slika 14: K-S test za dečke in deklice OŠ Žužemberk

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | dečki | deklice |
|-----------------------------------|----------------|--------|---------|
| N | | 32 | 30 |
| Normal Parameters ^{a, b} | Mean | 12,413 | 12,8133 |
| | Std. Deviation | 1,2986 | 1,14221 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,166 | ,129 |
| | Positive | ,166 | ,063 |
| | Negative | -,081 | -,129 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,940 | ,705 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,340 | ,703 |

a. Test distribution is Normal.

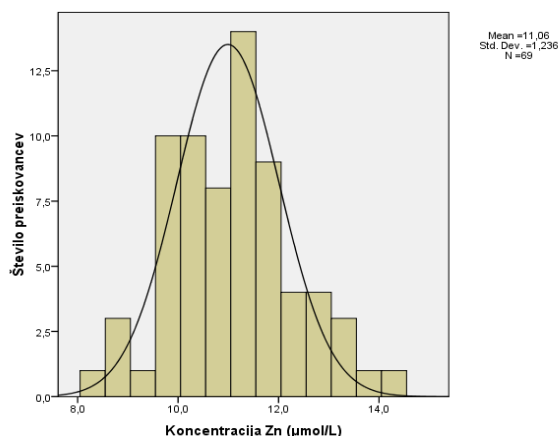
b. Calculated from data.

5.1.3 Osnovna šola Idrija

V zadnji skupini so učenci OŠ Idrija, ki prihajajo iz obremenjenega okolja z težkimi kovinami, saj se v Idriji nahaja rudnik živega srebra, ki sedaj ne obratuje več. Del tega

rudnika danes služi kot muzej. Tudi pri tej skupini je iz histograma razvidno, da se vrednosti porazdeljujejo normalno.

Histogram 7: Koncentracija Zn-OŠ Idrija



Slika 15: K-S test za OŠ Idrija

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | KZn |
|-----------------------------------|----------------|--------|
| N | | 69 |
| Normal Parameters ^{a, b} | Mean | 11,059 |
| | Std. Deviation | 1,2357 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,078 |
| | Positive | ,078 |
| | Negative | -,049 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,647 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,797 |

a. Test distribution is Normal.

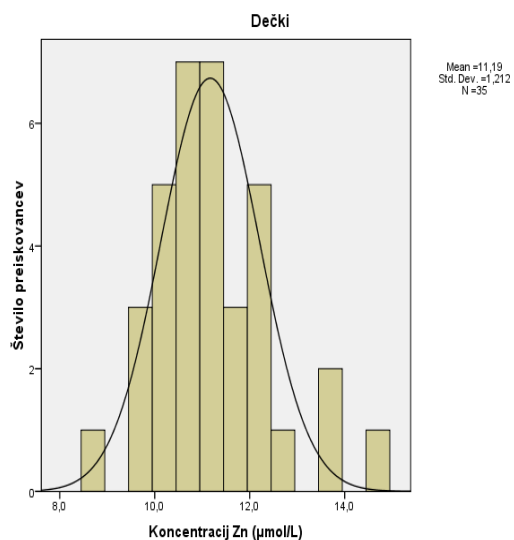
b. Calculated from data.

Vrednosti koncentracij Zn v plazmi se porazdeljujejo normalno ($p > 0,05$), kot je razvidno iz Kolmogorov-Smirnovskega testa (slika 15).

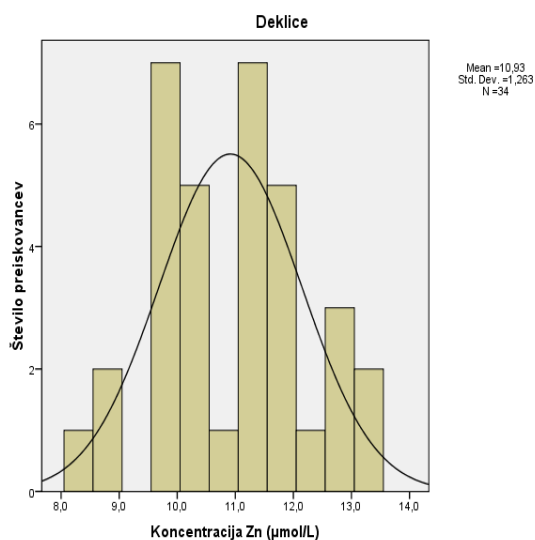
Tudi to skupino smo razdelili glede na spol, še vedno se obe skupini porazdelujeta normalno.

To prikazujeta histograma 8 in 9 ter Kolmogorov-Smirnov test (slika).

Histogram 8: Koncentracija Zn-dečki



Histogram 9: Koncentracija Zn-deklice



Slika 16: K-S za dečke in deklice OŠ Idrija

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | deklice | dečki |
|----------------------------------|----------------|---------|--------|
| N | | 34 | 35 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 10,9265 | 11,189 |
| | Std. Deviation | 1,26331 | 1,2124 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,102 | ,125 |
| | Positive | ,102 | ,125 |
| | Negative | -,084 | -,057 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,593 | ,738 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,873 | ,647 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

5.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMI

Po analizi posamezne šole smo izvedli še primerjavo med skupinami otrok iz OŠ Vižmarje-Brod, OŠ Žužemberk in OŠ Idrija. Za skupinsko primerjavo smo uporabili parametrične teste, saj so bile porazdelitve koncentracij normalne.

5.2.1 Levenejev test

Levenejev test smo uporabili za testiranje homogenosti (enakost) varianc. Iz slike 17 je razvidno, da so variance skupin homogene ($p > 0,05$), ta rezultat je pomemben za izvedbo enosmernega testa ANOVA.

Slika 17: Levenejev test za vse OŠ

Test of Homogeneity of Variances

| KZn | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| ,165 | 2 | 170 | ,848 |

5.2.2 Enosmerni test ANOVA

Test ANOVA je parametrični test, s katerim ugotovimo, ali med skupinami sploh obstajajo kakšne razlike.

Slika 18: Rezultat testa ANOVA za vse OŠ

ANOVA

| KZn | | | | | |
|----------------|----------------|-----|-------------|--------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 132,591 | 2 | 66,295 | 45,283 | ,000 |
| Within Groups | 248,882 | 170 | 1,464 | | |
| Total | 381,473 | 172 | | | |

Variance se med skupinami ne razlikujejo statistično značilno ($p = 0,848$), zato je ANOVA veljavna. P-vrednost znaša $0,000 < 0,05$, zato ničelno hipotezo zavrnamo in lahko rečemo,

da se koncentracija cinka v krvi otrok posamezne skupine glede na osnovno šolo statistično značilno razlikuje. Rezultat testa je razviden iz slike 18.

Ugotovili smo, da razlika med skupinami obstaja, zato smo izvedli še test za primerjavo parov, da smo ugotovili, kje so te razlike. Za ugotavljanje razlik smo opravili dodatno analizo, ki se imenuje post-hoc analiza (Tukey-ev HSD pristop). Z njo primerjamo povprečja med tremi skupinami (povprečje vsake skupine primerjamo s povprečjem preostalih dveh skupin).

Slika 19: Rezultat Tukey-evega testa za vse OŠ

Multiple Comparisons

KZn
TukeyHSD

| (I) OŠ | (J) OŠ | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------|--------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 1,00 | 2,00 | -2,1231* | ,2418 | ,000 | -2,695 | -1,551 |
| | 3,00 | -,5761* | ,2368 | ,042 | -1,136 | -,016 |
| 2,00 | 1,00 | 2,1231* | ,2418 | ,000 | 1,551 | 2,695 |
| | 3,00 | 1,5470* | ,2117 | ,000 | 1,046 | 2,048 |
| 3,00 | 1,00 | ,5761* | ,2368 | ,042 | ,016 | 1,136 |
| | 2,00 | -1,5470* | ,2117 | ,000 | -2,048 | -1,046 |

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

OŠ 1: OŠ Vižmarje-Brod

OŠ 2: OŠ Žužemberk

OŠ 3: OŠ Idrija

Iz rezultatov testov, ki so prikazani v sliki 19, je razvidno, da se vse tri šole med sabo statistično razlikujejo. Med skupinami otrok OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Žužemberk ter med skupinami otrok OŠ Žužemberk in OŠ Idrija je največja statistična razlika. Med skupinami otrok OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrijo pa je veliko manjša statistična razlika.

Poleg primerjav med skupinami glede na osnovno šolo smo izvedli še primerjavo med spoloma glede na OŠ, uporabili smo iste teste, kot pri prejšnji analizi.

5.2.2.1 Dečki

Slika 20: Rezultat Levenejevega testa za dečke

Test of Homogeneity of Variances

KZn

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| ,010 | 2 | 83 | ,990 |

Slika 21: Rezultat testa ANOVA za dečke

ANOVA

KZn

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 49,834 | 2 | 24,917 | 16,797 | ,000 |
| Within Groups | 123,122 | 83 | 1,483 | | |
| Total | 172,956 | 85 | | | |

Slika 22: Rezultat Tukey-evega testa za dečke

Multiple Comparisons

KZn
Tukey HSD

| (I) OŠ | (J) OŠ | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------|--------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 1,00 | 2,00 | -1,9336* | ,3527 | ,000 | -2,775 | -1,092 |
| | 3,00 | -,7096 | ,3471 | ,108 | -1,538 | ,119 |
| 2,00 | 1,00 | 1,9336* | ,3527 | ,000 | 1,092 | 2,775 |
| | 3,00 | 1,2239* | ,2979 | ,000 | ,513 | 1,935 |
| 3,00 | 1,00 | ,7096 | ,3471 | ,108 | -,119 | 1,538 |
| | 2,00 | -1,2239* | ,2979 | ,000 | -1,935 | -,513 |

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Iz zgornjih testov je razvidno, da se skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Žužemberk statistično razlikujeta, saj je $p=0,000$. Tudi skupini dečkov iz OŠ Žužemberk in OŠ Idrija se statistično razlikujeta ($p=0,000$). Skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrija pa se statistično značilno ne razlikujeta, saj je vrednost $p=0,108$.

5.2.2.2 Deklice

Slika 23: Rezultat Levenejevega testa za deklice

Test of Homogeneity of Variances

KZn

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| ,453 | 2 | 83 | ,637 |

Slika 24: Rezultat testa ANOVA za deklice

ANOVA

KZn

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 84,097 | 2 | 42,049 | 29,511 | ,000 |
| Within Groups | 118,263 | 83 | 1,425 | | |
| Total | 202,361 | 85 | | | |

Slika 25: Rezultat Tukeyevega test za deklice

Multiple Comparisons

KZn
Tukey HSD

| (I) OŠ | (J) OŠ | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------|--------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 1,00 | 2,00 | -2,3264* | ,3308 | ,000 | -3,116 | -1,537 |
| | 3,00 | -,4979 | ,3242 | ,280 | -1,272 | ,276 |
| 2,00 | 1,00 | 2,3264* | ,3308 | ,000 | 1,537 | 3,116 |
| | 3,00 | 1,8285* | ,3011 | ,000 | 1,110 | 2,547 |
| 3,00 | 1,00 | ,4979 | ,3242 | ,280 | -,276 | 1,272 |
| | 2,00 | -1,8285* | ,3011 | ,000 | -2,547 | -1,110 |

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Iz zgornjih treh slik je razvidno, da se tudi skupini deklic iz OŠ Vižmarje Brod in OŠ Idrija statistično značilno ne razlikujeta, saj je vrednost $p=0,208$ in je tako še manjša razlika kot pri dečkih.

6 RAZPRAVA

Cink je zelo razširjen v naravi, zraku in vodi. Je mineral z raznovrstno in zelo pomembno vlogo v človeškem organizmu. Pomanjkanje cinka lahko vodi v resne zaplete, zato je v določenih primerih potrebno dodajanje cinkovih dopolnil. Ker je območje med pozitivnim in toksičnim učinkom ozko, moramo biti pozorni tako na spodnjo kot tudi na zgornjo mejo referenčnega intervala. Referenčni interval za koncentracijo cinka je zelo odvisen od starosti in spola.

Da bi ugotovili, ali se koncentracija cinka v plazmi razlikuje glede na to, kje živimo, in ali so prebivalci v urbanem okolju preobremenjeni s težkimi kovinami ter kakšen vpliv ima rudnik na nivo cinka prebivalcev Idrije in kakšen je nivo cinka prebivalcev v mestu, smo v našo raziskavo vključili 173 vzorcev otrok starih od 8 do 11 let, za katere smo določili mejno vrednost, ki znaša $10,0-19,7\mu\text{mol/L}$.

Rezultate smo najprej primerjali glede posamezne osnovne šole in ugotovili, da so vse povprečne vrednosti Zn v meji referenčnega intervala.

Žužemberk je gručasto naselje na obeh bregovih reke Krke. Danes dobiva naselje vedno bolj mestno podobo, ne glede na to, da je obdelovanje zemlje (kmetijstvo) še vedno pomembna dejavnost številnih krajanov.

Skupina otrok iz Žužemberka je imela najvišjo koncentracijo cinka v krvi c Zn= $12,60\mu\text{mol/L}$, vendar je ta vrednost v meji referenčnega intervala.

Idrija leži v kotlini sredi idrijskega hribovja, kjer se ob znameniti tektonski prelomnici stikata predalpski in kraški svet. Kot najstarejše slovensko rudarsko mesto je Idrija rasla vzporedno z razvojem rudnika živega srebra. Rudarstvo so danes zamenjale sodobne industrijske panoge, rudnik pa uporabljajo samo še za turistične namene. Kljub temu da je to območje obremenjeno s težkimi kovinami, je imela skupina otrok iz Idrije koncentracijo Zn v referenčnem intervalu, znašala pa je c Zn= $11,06\mu\text{mol/L}$.

Vižmarje-Brod je predmestje Ljubljane, tu prevladujejo predvsem individualne hiše.

Najnižjo koncentracijo cinka je imela skupina otrok iz Vižmarje-Broda, znašala je $10,48\mu\text{mol/L}$.

Vse tri skupine otrok smo razdelili v podskupine glede na spol in ni bilo razlik.

Koncentracije cinka 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 Zn v krvi preiskovanih otrok značilno razlikujejo ($p > 0,05$). Med skupinami otrok OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Žužemberk ter med skupinami otrok OŠ Žužemberk in OŠ Idrija je največja statistična razlika. Med skupinami otrok OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrija pa je veliko manjša statistična razlika. Vse tri skupine otrok smo nato še razdelili v podskupine glede na spol. Skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Žužemberk se statistično razlikujeta, saj je $p = 0,000$. Tudi skupini dečkov iz OŠ Žužemberk in OŠ Idrija se statistično razlikujeta ($p = 0,000$). Skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrija pa se statistično značilno ne razlikujeta, saj je vrednost $p = 0,108$. Tudi skupini deklic iz OŠ Vižmarje Brod in OŠ Idrija se statistično značilno ne razlikujeta, saj je vrednost $p = 0,208$ in je tako še manjša razlika kot pri dečkih.

Grčija je v primerjavi z drugimi državami članicami EU zaradi omejenih možnosti za industrijski razmah še vedno država v razvoju.

Četudi se zadnje čase kaže premik v industrijskem procesu je Grčija predvsem kmetijska dežela, saj pridelujejo tobak, koruzo, riž, pšenico, svilo, oljčno olje in sadje. Grški industrijski razvoj zaostaja zaradi pomanjkanja surovin; rudno bogastvo je sicer raznovrstno, a količinsko zelo omejeno. V Grčiji kopljejo predvsem lignit, boksit za proizvodnjo aluminija, železo, mangan, magnezij in marmor. Ena glavnih težav, ki tarejo grško gospodarstvo, pa je pomanjkanje nafte, metana in črnega premoga. Industrija obsega v glavnem živilsko in turistično področje, ladjedelništvo, kovinsko predelovalno, obutveno in tekstilno industrijo.

V raziskavi koncentracij cinka in bakra v serumu 105 grških otrok starih med 3-14 let, je bila povprečna koncentracija Zn $15,01 \mu\text{mol/L}$, kar je v mejah referenčnih vrednosti, razlik med dečki in deklicami skoraj ni bilo.

V primerjavi z našimi rezultati, je koncentracija cinka otrok iz Grčije dosti višja. Najbolj primerljiva je z koncentracijo otrok iz OŠ Žužemberk. Iz tega lahko sklepamo, da je koncentracija najbolj primerljiva, ravno zaradi tega ker obe skupini otrok prihajajo iz

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

podeželja, kjer ni večjih industrij, prevladuje pa predvsem kmetijstvo. Cink se v kmetijstvu zelo pogosto uporablja, za razna škropiva, kar lahko vpliva tudi na koncentracijo cinka v krvi otrok.

7 SKLEP

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali se vrednosti koncentracije cinka v krvi otrok značilno razlikujejo glede na to, v kakšnem okolju živimo.

- Iz naših rezultatov je razvidno, da otroci, ki smo jih zajeli v preiskavo, povprečno nimajo povišanih koncentracij cinka v krvi, ne glede na to, ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.
- Različni statistični testi, ki smo jih opravili, nam dokažejo in lahko zato trdimo, da se koncentracije cinka v krvi statistično značilno razlikujejo glede na to, v kakšnem življenjskem okolju živijo otroci.
- Skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Žužemberk se statistično razlikujeta ter skupini dečkov iz OŠ Žužemberk in OŠ Idrija se statistično razlikujeta. Skupini dečkov iz OŠ Vižmarje-Brod in OŠ Idrija pa se statistično značilno ne razlikujeta. Skupini deklic iz OŠ Vižmarje Brod in OŠ Idrija se statistično značilno ne razlikujeta.
- Najnižja koncentracija cinka v krvi je pri otrocih iz osnovne šole Vižmarje-Brod, ki predstavljajo otroke iz urbanega okolja. Najvišje vrednosti so imeli otroci iz Žužemberka, predstavniki kmečkega okolja.
- Rudnik v Idriji nima nobenega vpliva na koncentracijo cinka v krvi pri preiskovancih iz OŠ Idrija, saj so le te vrednosti v referenčnem intervalu.

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 referenčne vrednosti vnosa.

8 LITERATURA

1. Oddelek za laboratorijsko delo-dejavnost oddelka
<http://www.ukc-mb.si/index.php?id=222> (dostopano 30.1.2010)
2. Šturm A.: Koncentracija selena v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali obremenjenem okolju; Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
3. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.
<http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/> (dostopano 5.2.2010)
4. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V. Recommended daily intake of vitamins and minerals
<http://www.lenntech.com/recommended-daily-intake.htm>(dostopano 5.2.2010)
5. Štraus B.: Medicinska biokemija. Drugo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada. Zagreb 1992; str. 773-813.
6. Barker WH & Wood WB Jr: Severe febrile iodism during the treatment of hyperthyroidism. Jama, 1940; str. 114: 1029-1038.
7. Roth R: Cellular Nutrition: Nickel&Cobalt
URL « <http://www.acu-cell.com/nico.html> «
8. Reynolds J: Martindale, the extra pharmacopeia, 29th ed. London, The Pharmaceutical Press, 1989; str. 1184-1186.
9. Istenič B.: Sprejem cinka iz onesnaženih tal MO Celje v izbrane rastline; Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2005
10. Wikipedia: Cink (dostopano 14.5.2009).
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Cink> (dostopano 3.3.2010)
11. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.: Zinc
<http://www.lenntech.com/Periodic-chart-elements/Zn-en.htm> (dostopano 3.3.2010)
12. Pajk Žontar T.: Pomen cinka; VIP-ISSN 1318-1084. Letnik 18, št.10; 2008: str. 39.
13. Nemško prehransko društvo, Avstrijsko prehransko društvo, Švicarsko društvo za raziskovanje prehrane in Švicarsko združenje za prehrano: Referenčne vrednosti za vnos hranil. 1.izdaja, Ministarstvo za zdravje, Ljubljana 2004; str. 173-175.

14. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler: Osnove analitičke kemije. Prvo izdanje (hrvatsko). Školska knjiga. Zagreb 1999.
15. Shauna C. Anderson, Susan Cockayne: Clinical Chemistry: concepts and applications. Philadelphia: W.B. Saunders, cop.1993.
16. Poljšak B. in sod.: Pregled esencialnih mikroelementov in njihove vloge v ohranjanju zdravja in vitalnosti človeka. Ljubljana, 2009
17. David W. Martin, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell, Daryl K. Granner: Harperov pregled biohemije. Drugo izdanje. Beograd. Savremena administracija, 1989; str. 751, 755, 773, 152-153.
18. Richard A. McPherson MD, Matthew R. Pincus: Henry's clinical diagnosis and managment by laboratory methods. Twenty-first edition. Philadelphia: Saunders Elsevier, cop.2007; 31-40, 387-388.
19. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. St.Louis (Missouri): Elsevier Saunders, cop.2006; str. 1118-1122, 1137-1142.
20. S. Kreft, S. Pečar: Vloga radikalov pri obolenjih, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Farmacevtski vestnik 1998 (Št:4); str. 469-481.
21. Črne-Finderle N. karcinogeneza, V: patološka fiziologija, izbrana poglavja, Ur.: S.Ribarič, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 1995; str. 59-75.
22. Linus Pauling Institute: Micronutrient Research for Optimum Health
<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/zinc/> (dostopano 22.3.2010)
23. Wikipedia: Fitična kislina.
http://sl.wikipedia.org/wiki/Fiti%C4%8Dna_kislina (dostopano 22.3.2010)
24. Wikipedia: Vitamin A.
http://sl.wikipedia.org/wiki/Vitamin_A (dostopano 24.3.2010)
25. Naumov A.: Določanje oligoelementov v laseh; Diplomsko delo; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 1997.
26. Kabata – Pendias a., Pendias H. 1984: Trace Elements in Soil and Plants. Boca Raton, Florida, CRC Press; str. 315.
27. Leštan D. 2002. Ekopedologija, študijsko gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo. Katedra za pedologijo in varstvo okolja; str. 268.

28. Bačac 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.
29. Poljšak B., Ovca A., Raspor P.: Pregled esencialnih mikroelementov in njihove vloge v ohranjanju zdravja in vitalnosti človeka.
30. Schröter W., Lautenschläger, K. H., Bibrack, H.: Kemija: splošni priročnik; 1. izd., Ljubljana, 1933; str. 431-435.
31. Caballero B., Trugo L.C.: Encyclopedia of food sciences and nutrition; Amsterdam [etc.] : Academic Press : Elsevier Science, 2003; str. 6267-6283.
32. Symposium on Clinical Nutrition; Philip A. Walravens, MD Denver: Zinc Metabolism and Its Implications in Clinical Medicine; str. 133-141.
33. Naše meritve za vašo gotovost; Kalibracije merilnih sistemov
http://www.siq.si/meroslovje/storitve/kalibracije_merilnih_instrumentov/kalibracija_tekst/index.html (dostopano 4.5.2010)
34. Atomic Absorption Spectroscopy; Elena Sevostianova
http://weather.nmsu.edu/teaching_material/soil698/student_reports/spectroscopy/report.htm (dostopano 4.5.2010)
35. Absorption spectroscopy, From Wikipedia, the free encyclopedia
http://en.wikipedia.org/wiki/Absorption_spectroscopy (dostopano 4.5.2010)
36. Welz B., Sperling M.: Atomic absorption spectrometry; 3rd comp. rev. ed, Wiley-VCH, 1999; str. 85-106.

9 PRILOGA

Uporabljeni podatki v diplomski nalogi.

| Število vzorcev | OŠ VIŽMARJE BROAD Koncentracija cinka ($\mu\text{mol/L}$) | OŠ ŽUŽEMBERK Koncentracija cinka ($\mu\text{mol/L}$) | OŠ IDRİJA Koncentracija cinka ($\mu\text{mol/L}$) |
|-----------------|---|--|---|
| 1 | 11,5 | 10,6 | 11,2 |
| 2 | 9,9 | 12,8 | 12,7 |
| 3 | 10,0 | 12,0 | 13,6 |
| 4 | 12,7 | 12,7 | 10,8 |
| 5 | 11,7 | 12,9 | 8,7 |
| 6 | 8,9 | 12,6 | 9,5 |
| 7 | 10,0 | 12,6 | 11,1 |
| 8 | 10,5 | 11,4 | 10,7 |
| 9 | 11,6 | 12,8 | 13,5 |
| 10 | 10,7 | 12,8 | 11,0 |
| 11 | 11,4 | 17,4 | 10,4 |
| 12 | 9,0 | 12,1 | 12,0 |
| 13 | 9,7 | 12,8 | 9,7 |
| 14 | 9,7 | 12,1 | 11,4 |
| 15 | 11,0 | 11,4 | 10,3 |
| 16 | 9,0 | 12,6 | 11,7 |
| 17 | 10,8 | 13,8 | 12,3 |
| 18 | 9,5 | 13,5 | 12,3 |
| 19 | 11,5 | 12,5 | 10,6 |
| 20 | 11,1 | 13,2 | 11,7 |
| 21 | 10,8 | 11,5 | 11,1 |
| 22 | 10,0 | 10,6 | 12,0 |
| 23 | 9,0 | 10,7 | 10,1 |
| 24 | 11,4 | 12,1 | 11,2 |
| 25 | 13,6 | 14,6 | 9,7 |
| 26 | 9,8 | 11,0 | 14,5 |
| 27 | 9,5 | 12,2 | 12,1 |
| 28 | 9,2 | 11,3 | 10,2 |
| 29 | 8,8 | 11,8 | 11,5 |
| 30 | 10,7 | 11,5 | 10,5 |
| 31 | 10,0 | 13,1 | 10,9 |
| 32 | 11,8 | 12,2 | 11,2 |
| 33 | 12,0 | 14,3 | 10,7 |
| 34 | 9,9 | 13,1 | 10,7 |
| 35 | 11,2 | 12,8 | 10,0 |
| 36 | 8,7 | 14,1 | 11,1 |

Bergant K. Določanje cinka v krvi pri otrocih, glede na to ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju.

Diplomsko delo

| | | | |
|----|------|------|------|
| 37 | 10,3 | 15,1 | 8,3 |
| 38 | 10,9 | 12,8 | 13,2 |
| 39 | 9,7 | 11,2 | 10,5 |
| 40 | 10,2 | 13,3 | 11,8 |
| 41 | 12,2 | 12,6 | 9,0 |
| 42 | 10,4 | 11,8 | 9,6 |
| 43 | | 13,9 | 11,2 |
| 44 | | 13,4 | 9,8 |
| 45 | | 13,0 | 12,5 |
| 46 | | 13,5 | 11,6 |
| 47 | | 12,9 | 12,9 |
| 48 | | 13,8 | 11,1 |
| 49 | | 12,9 | 12,6 |
| 50 | | 14,2 | 9,7 |
| 51 | | 12,2 | 9,9 |
| 52 | | 12,6 | 11,3 |
| 53 | | 12,8 | 9,7 |
| 54 | | 10,4 | 11,2 |
| 55 | | 10,8 | 11,8 |
| 56 | | 12,5 | 10,3 |
| 57 | | 13,4 | 10,3 |
| 58 | | 13,0 | 12,6 |
| 59 | | 12,4 | 11,7 |
| 60 | | 11,7 | 9,8 |
| 61 | | 10,2 | 10,1 |
| 62 | | 13,7 | 12,0 |
| 63 | | 10,6 | 13,2 |
| 64 | | | 11,1 |
| 65 | | | 11,5 |
| 66 | | | 9,9 |
| 67 | | | 10,2 |
| 68 | | | 11,0 |
| 69 | | | 9,0 |