

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREA TUNJIĆ

**DIPLOMSKA NALOGA**

Visokošolski strokovni program  
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREA TUNJIĆ

**PRIMERJAVA KONCENTRACIJ ENCIMA  
N-ACETIL GLUKOZAMINIDAZE PRI OTROCIH IZ  
OBREMENJENEGA, MESTNEGA ALI KMEČKEGA OKOLJA**

**COMPARISON OF CONCENTRATIONS ON ENZYME N-ACETYL  
GLUCOSAMINIDASE IN CHILDREN FROM BURDENED, URBAN  
OR RURAL ENVIRONMENT**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja. Določitve NAG v urinu so bile izvedene v laboratoriju za analizo encimov in elementov v sledovih na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

## **ZAHVALA**

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju prof.dr. Jošku Osredkarju za strokovno svetovanje, potrpežljivost in vzpodbudo pri nastajanju diplomskega dela.

Najlepše pa se zahvaljujem tudi moji družini in prijateljem za neizčrpno podporo v času mojega študija.

## **IZJAVA**

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

Ljubljana, 2010

Predsednik diplomske komisije: redni profesor dr. Samo Kreft

Član diplomske komisije: doc. dr. Robert Roškar

# KAZALO

1 UVOD.....	1
1. 1 LEDVICE.....	2
1. 1. 1 Delovanje ledvic .....	3
1. 1. 2 Nastanek urina .....	4
1. 1. 3 Laboratorijske preiskave urina .....	4
1. 1. 4 Urinarni biomarkerji .....	6
1. 1. 5 Kovine – vpiv na ledvice.....	7
1. 1. 6 Bolezni ledvic .....	8
1. 1. 7 Preiskave pri bolniku z ledvično boleznijo .....	9
1. 2 TEŽKE KOVINE .....	10
1. 2. 1 Mehanizem delovanja težkih kovin .....	10
1. 2. 2 Poškodba mitohondrijev.....	11
1. 2. 3 Motnje imunskega sistema .....	12
1. 2. 4 Vpliv na specifično imunost.....	13
1. 3 ŽIVO SREBRO (Hg).....	13
1. 3. 1 Oblike in nahajanje .....	13
1. 3. 2 Mehanizem toksičnosti.....	14
1. 3. 3 Vnos v telo in izločanje .....	14
1. 3. 4 Klinična slika.....	15
1. 3. 5 Teratogenost in kancerogenost .....	16
1. 3. 6 Biološki indikatorji .....	16
1. 3. 7 Laboratorijska diagnostika .....	17
1. 3. 8 Zdravljenje.....	17
1. 4 SVINEC (Pb).....	17
1. 4. 1 Oblike in izpostavljenost .....	17
1. 4. 2 Mehanizem toksičnosti.....	18
1. 4. 3 Vnos v telo in izločanje .....	18
1. 4. 4 Klinična slika .....	19
1. 4. 5 Teratogenost in kancerogenost .....	20
1. 4. 6 Biološki indikatorji .....	21
1. 4. 7 Laboratorijska diagnostika .....	21
1. 4. 8 Zdravljenje.....	22
1. 5 KADMIJ (Cd).....	22
1. 5. 1 Oblike in nahajanje .....	22
1. 5. 2 Mehanizem toksičnosti.....	22
1. 5. 3 Vnos v telo in izločanje .....	23
1. 5. 4 Klinična slika.....	23
1. 5. 5 Teratogenost in kancerogenost .....	24
1. 5. 6 Biološki indikatorji .....	24
1. 5. 7 Laboratorijska diagnostika .....	24
1. 5. 8 Zdravljenje.....	25
1. 6 ARZEN (As).....	25
1. 6. 1 Oblike in nahajanje .....	25
1. 6. 2 Mehanizem toksičnosti.....	26
1. 6. 3 Vnos v telo in izločanje .....	26
1. 6. 4 Klinična slika .....	26

1. 6. 5 Teratogenost in kancerogenost .....	27
1. 6. 6 Biološki indikatorji .....	27
1. 6. 7 Laboratorijska diagnostika .....	28
1. 6. 8 Zdravljenje.....	28
1. 7 DOLOČANJE TEŽKIH KOVIN .....	28
1. 8 NAG (N-acetil $\beta$ -D-glukozaminidaza) .....	29
1. 8. 1 Struktura in sinteza.....	30
1. 8. 2 Izoencimi NAG .....	30
1. 8. 3 Pomen dokazovanja NAG .....	31
1. 8. 4 Metode za merjenje NAG.....	31
1. 8. 5 Vzorec za določitev NAG .....	32
2 NAMEN DELA .....	34
3 MATERIALI IN METODE.....	35
3. 1 Vzorci.....	35
3. 2 Opis spektrofotometrične metode.....	35
3. 3 Princip metode in reakcija.....	37
3. 4 Material, aparature in reagenti.....	37
3. 5 Postopek in pogoji merjenja.....	38
3. 6 Izračun, interpretacija rezultata in orientacijske vrednosti .....	39
4 EKSPERIMENTALNI DEL.....	40
4. 1 Zbiranje podatkov.....	40
4. 2 Obdelava podatkov .....	40
4. 3 Skupinska analiza .....	40
4. 4 Analiza skupinskih rezultatov .....	40
5 REZULTATI.....	41
6 RAZPRAVA .....	45
7 SKLEPI.....	47
8 LITERATURA.....	49
9. PRILOGA .....	52

## KAZALO TABEL

Tabela 1: povprečne vrednosti NAG za vsako šolo posebej .....	41
Tabela 2: povprečne vrednosti NAG glede na spol .....	42
Tabela 3: primerjava med spoloma (t-test).....	42
Tabela 4: primerjava konc. NAG med šolami in spoloma .....	43
Tabela 5: primerjava med šolami (t-test).....	44
Tabela 6: število otrok s preseženimi koncentracijami .....	44

## **KAZALO SLIK**

Slika 1: zgradba ledvice.....	2
Slika 2: SESTAVA APARATA - Atomska absorpcijska spektrofotometrija.....	29
Slika 3: skica spektrofotometra.....	36
Slika 4: shema reakcije.....	37
Slika 5: postopek merjenja.....	38

## **KAZALO GRAFOV**

Graf 1: povprečne vrednosti NAG za vsako šolo posebej.....	41
Graf 2: povprečne vrednosti NAG glede na spol.....	42
Graf 3: primerjava konc. NAG med šolami in spoloma.....	43

## POVZETEK

N-acetilglukozaminidaza (NAG) je lizosomalni encim, visoke molekulske mase, ki ga najdemo v mnogih tkivih telesa. Njegova prisotnost v urinu je dober pokazatelj funkcije ledvic. V našem okolju je prisotno ogromno škodljivih snovi in težkih kovin. Ledvice so eden izmed glavnih tarčnih organov za težke kovine in različne organske spojine, ki se lahko kopičijo v ledvicah. S tem povzročajo poškodbo predvsem v tubulnem delu ledvic, in na glomerulih. Pri takšnih poškodbah je povečana koncentracija NAG v urinu, tako s tem lahko ocenimo stopnjo poškodovanosti ledvic.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, ali se koncentracije NAG v urinu razlikujejo glede na kraj bivanja. Prav tako nas je zanimalo, ali imajo prebivalci, ki so bolj obremenjeni s težkimi kovinami, že kakšne okvare ledvic, kar bomo ugotovili v primeru povišane koncentracije NAG. V ta namen smo analizirali 181 vzorcev otrok, starih med 7 in 12 let, ki smo jih dobili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Rezultate smo statistično ovrednotili in grafično prikazali z računalniškim programom Microsoft Excel in SPSS 17.0 za Windows.

Rezultati, ki smo jih dobili s povprečno vrednostjo, niso v nobenem primeru presegle zastavljeno mejo, ki je za NAG od 1,45 do 9,19  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . Povprečne vrednosti med učenci iz vseh treh šol se razlikujejo. Najmanjše povprečne vrednosti so imeli v Žužemberku, najvišje pa v Idriji. Najvišja izmerjena koncentracija je v Idriji, in sicer 19,25  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . Tu je bilo 7 učencev, ki so imeli povišano koncentracijo; v Žužemberku in Brodu sta bila le po 2 učenca s povišanimi koncentracijami. Primerjali smo tudi povprečne vrednosti glede na spol ter ugotovili razlike med dečki in deklicami. Dečki so imeli dosti nižje koncentracije medtem ko je bila pri deklicah razpršenost v koncentracijah večja. Na koncu smo še primerjali koncentracijo NAG med šolami in spoloma ter ugotovili, da so pri vseh šolah koncentracije deklic večje od dečkov. Najvišjo povprečno koncentracijo imajo deklice iz Idrije, najmanjšo pa iz Žužemberka. Tudi dečki iz Idrije imajo višje koncentracije kot dečki iz Broda in Žužemberka.

Iz rezultatov je razvidno, da imajo največje koncentracije NAG otroci iz obremenjenega okolja, vendar povprečne vrednosti ne presegajo zastavljene meje.

## ABSTRACT

NAG is a lysosomal enzyme of high molecular weight and can be found in many tissues of the body. Its presence in urine is a good indicator of the renal function. In our environment there are a lot of harmful substances and heavy metals. Kidneys are one of the main target organs of heavy metals and various organic compounds that can accumulate in the kidneys. Thereby causing particular damage in renal tubular part and the glomeruli. In such injuries the concentration of NAG in the urine is increased and thus we can estimate the degree of kidney damage.

The thesis was to determine whether the concentration of NAG in the urine varies according to the place of residence. In addition we wanted to see whether the people who are more burdened with heavy metal, already have any kidney damage, which will show in case of elevated concentrations of NAG. To this end, we analyzed 181 samples of children aged between 7 and 12 years, obtained by the Clinical Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry. The results were statistically evaluated and graphically demonstrated by computer program Microsoft Excel and SPSS 17.0 for Windows.

The results that we obtained with an average value did not exceed the set limit of NAG from 1,45 to 9,19  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$  in any case. Average values among pupils from all three schools are different. Minimum average values were given in Žužemberk, highest in Idrija. The highest concentration was measured in Idrija, namely 19.25  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . There were 7 pupils with increased concentration; in Žužemberk and Brod there were only 2 pupils with higher concentrations. We also compared the average value in relation to sex and found differences between boys and girls. The boys had a much lower concentration, while the girls had a greater dispersion in concentrations. Finally, we have compared the levels of NAG between the schools and genders and found that in all schools the concentrations of girls are higher than concentrations of boys. Girls from Idrija have the highest average concentration, while the lowest was in Žužemberk. Also boys from Idrija have higher concentrations than the boys from Brod and Žužemberk.

The results show that the children from environment loaded with pollution have the highest concentrations of NAG, but the average values do not exceed the set limits.



# SEZNAM OKRAJŠAV

<i>Oznaka:</i>	<i>Opis:</i>
NAG	N-acetil glukozaminidaza
mg	miligram
ml	mililiter
CCl <sub>4</sub>	ogljikov tetra klorid
GSH	glutation
IgG	imunoglobulin
ATP	adenozin trifosfat
t.i.	tako imenovano
oz.	oziroma
SH	žveplova skupina
EDTA	etilendiamin tetraacetat
HCl	klorovodikova kislina
CŽS	centralni živčni sistem
α-ALA	alfalipoična kislina
2M	2 molarna (mol/L)
GlcNAc	polisaharidna enota
A <sup>s</sup>	izoencim

# 1 UVOD

Težke kovine so lahko za rastline, živali in človeka toksične. Ljudje in živali lahko sprejemajo težke kovine preko rastlin ter direktno z vdihavanjem težkih kovin bogatih prašnih delcev in zaužitjem onesnaženih talnih delcev. Med težke kovine prištevamo živo srebro (Hg), svinec (Pb), kadmij (Cd), arzen (As), baker (Cu), nikelj (Ni)...

Imajo veliko gostoto in so zdravju nevarne. Počasi se akumulirajo v organizmu in povzročajo nepopravljivo škodo. Škodljivost je posledica pojava, da njihovi ioni nadomeščajo ione drugih kovin, ki tvorijo aktivna mesta encimov v organizmih, zaradi česar ti encimi prenehajo delovati.

Težke kovine so navzoče v zemlji, v katero pridejo preko naravnih in antropogenih virov:

- naravna zasnova kamnin v zemlji,
- odpadni material pri izkopavanju v rudnikih,
- onesnaženje atmosfere,
- uporaba kmetijskih gnojil in agrokemikalij,
- vse vrste odplak, ki pronicajo v zemljo ter industrijski odpadki,
- umetna gnojila, apno.

Pomembne so tudi pri nastanku živčnih in avtoimunskih bolezni, rakastih obolenj ter srčnih težav.

Ledvice so eden izmed glavnih tarčnih organov za elemente težkih kovin in raznih organskih snovi, ki se v ledvicah lahko akumulirajo, in s tem povzročajo poškodbe predvsem v tubulnem delu ledvic, lahko pa tudi na glumerulih.

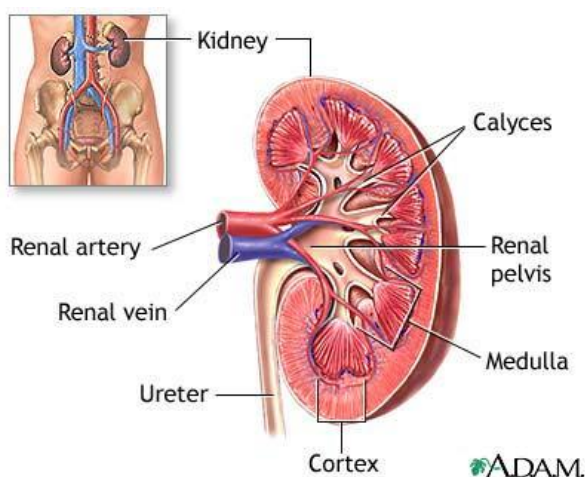
Težke kovine določamo z različnimi metodami. Če so povečane koncentracije, se pojavijo učinki, ki jih spremljamo z določitvijo parametrov. Eden izmed parametrov je koncentracija N-acetil glukozaminidaze (NAG) v urinu.

Encim N-acetil glukozaminidazo uvrščamo med hidrolaze in sodeluje pri razgradnji mukopolisaharidov in glukoproteinov. Obstajata dve molekularni obliki, ki se med seboj razlikujeta po naboju (izoencim A in izoencim B). Ločimo jih s temperaturno denaturacijo na 55°C. A oblika se uniči, ostane B izoencim, ki je temperaturno stabilnejši.

## 1. 1 LEDVICE

Ledvice so parni organ - leva in desna ledvica ležita tik ob hrbtenici retroperitonealno pod trebušno prepono; zaradi jeter je desna ledvica nekoliko nižje kot leva. Ledvice so fižolaste oblike, na njih ločimo prednjo in zadnjo stran, opisujemo pa zgornji in spodnji pol. Imajo dva robova, notranjega (vbočenega) in zunanjega (izbočenega). Na notranjem (vbočenem) delu je na sredini vdolbina, imenovana ledvična lina (hilus renalis), skozi katero vstopajo žile in živci, izstopa pa sečevod. Iz ledvične line vodijo žile v ozko špranjo, imenovano sinus renalis. Ledvice so 10 do 12 cm dolga, 6 cm široka in 4 cm debela, težke pa 120 do 200 gramov. Ovija jih fibrozna ovojnica, ki se tesno prilega ledvični površini. Ob ledvični lini prehaja ovojnica v vezivo ob žilah. Okoli te ovojnice je maščobno tkivo, imenujejo ga tudi maščobna ovojnica. Maščobno tkivo prekriva vezivo (tretja ledvična ovojnica).

Na prerezu ledvice vidimo zunanji del, ki ga imenujemo ledvična skorja (cortex renis), globlje pa je ledvična sredica (medulla renis), sestavljena iz 10 do 20 piramid, ki imajo osnovnice obrnjene proti površini ledvice, vrhovi pa gledajo proti renalnemu sinusu. Vrhovi piramid se imenujejo papile in molijo v ledvično čašico. Manjše čašice se spajajo v večje in se nato stekajo v večjo votlino, imenovano ledvični meh (pelvis renalis). Iz ledvičnega meha izhaja sečevod, po katerem odteka urin v mehur, ki je zbiralnik za urin, hkrati pa s krčenjem omogoča uriniranje. (Seč ali urin je tekočina, ki jo izločajo ledvice preko sečnih poti). Iz mehurja vodi sečnica.



Slika 1: zgradba ledvice

Funkcionalna enota ledvic je nefron (vsaka ledvica ima do milijon nefronov), ki je sestavljen iz ledvičnega telesca (Malpighijevo telesce) in kanalčka. Ledvično telesce se nahaja v ledvični skorji, in je sestavljeno iz glomerula in njegove ovojnice. Glomerul je v bistvu klopčič kapilar, ki ga obdaja kapsula; v njem se filtrira kri skozi kapilarno steno v kapsulni prostor - tako nastaja primarni urin. V glomerul priteče kri po arterioli, ki se razcepi v številne pentlje, te se nato zopet sestavijo in zberejo. Iz glomerulne kapsule izhaja cevčica (tubulus renalis), po kateri odteka urin; njen potek je dolg in zapleten, v njej potekata resorpcija in sekrecija ter nastaja končni urin, ki izteka v ledvična zbiralca, od tam pa odteka v ledvične čašice in nato v ledvični meh. (1)

### ***1. 1. 1 Delovanje ledvic***

1. *Izločanje odvečnih snovi iz telesa* (npr. končni produkti presnove beljakovin - sečnina, kreatinin itd.).

2. *Uravnavanje vode in elektrolitov v telesu.*

Intracelularne tekočine je v telesu 25 l ali 40 odstotkov telesne teže, ekstracelularne tekočine pa 15 l ali 20 odstotkov telesne teže. Ekstracelularna tekočina obdaja vse celice in je v posrednem stiku s krvjo in limfo v žilah. Med temi tekočinami obstaja filtracija in resorpcija. Kri je torej pretakajoča se faza notranjega okolja, ki zagotavlja stalno obnavljanje ekstracelularne tekočine. Ledvice imajo torej ključno vlogo pri homeostatskih mehanizmih. (2)

3. *Vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnotežja v krvi.*

- pH krvi je 7,35 do 7,45. Če se pH poveča na več kot 7,45, govorimo o alkaloziji, če se zmanjša na manj kot 7,35, pa o acidozi. Stalni pH krvi varujejo kemični puferji (bikarbonatni pufer-sistem), respiratorni kontrolni sistem in renalni mehanizmi. (2)

4. *Endokrine funkcije* (tvorba renina – pomagajo uravnati krvni tlak, eritropoetina spodbuja ustvarjanje eritrocitov v kostnem mozgu, aktivne oblike vitamina D, prostaglandinov itd.). (1)

5. *Izločanje telesu tujih snovi* (npr. zdravila, strupi itd.).

### ***1. 1. 2 Nastanek urina***

Pri nastanku urina sodelujejo trije mehanizmi, in sicer glomerulna filtracija, delna resorpcija glomerulnega filtrata iz lumna tubulov in tubulna sekrecija v urin. Ledvice uvrščamo med najbolj prekrvljene organe, saj v eni minuti dobijo približno 1,2 l krvi. V glomerulih nastaja iz krvi ultrafiltrat, ki ga imenujemo tudi primarni urin - dnevno ga nastane približno 180 litrov. Pri prehodu skozi različne dele tubulov pride do resorpcije različnih snovi in vode, nekatere snovi pa se tudi izločajo v urin; tako nastane končni urin, ki ga dnevno izločimo okoli 1,5 litra (količina je odvisna od številnih dejavnikov - pri dehidraciji se npr. izločanje urina zmanjša, urin pa je zelo koncentriran). (1)

### ***1. 1. 3 Laboratorijske preiskave urina***

Poudariti je potrebno, da je pomembno, kako pridobimo urin za preiskave (čas in način odvzema); najustreznejši je prvi jutranji vzorec urina, ki je oddan po načinu čistega močenja (očiščen izhod sečnice, oddaja srednjega curka urina); za odvzem urina danes redko uporabljamo kateter ali suprapubično punkcijo. Prav tako je pomembno, kako urin pred preiskavami shranimo (odvisno od nadaljnjih preiskav). Splošno velja, da je za preiskave najprimernejši sveži urin.

Urin je normalno bister, brezbarven ali rumene do jantarjeve barve. Barva je odvisna od urokromov, presnovkov, primesi hrane in morebitne uporabe zdravil. Specifična masa urina lahko niha pri zdravih ljudeh med 1,001 in 1,035 (primerjava z gostoto vzorca destilirane vode z enoto 1,000). Razen specifične mase določamo tudi ozmolalnost urina, oboje pa nam pomaga oceniti koncentracijske in dilucijske sposobnosti ledvic. Zdravi ljudje imajo pH urina med 4,5 in 8.

Zdrav človek izloči z urinom dnevno do 150 mg beljakovin, od tega jih je vsaj 50 % tubulnega izvora. Proteinurijo najpogosteje dokazujemo s preskusnimi lističi, ki pa ne zajemajo lahkih verig pri plazmocitomu. Semikvantitativno beljakovine dokazujemo s sulfosalicilno kislino, kvantitativno pa z biuretnim preskusom (določanje količine izločenih beljakovin v 24-urnem urinu). Proteinurija je lahko trajna ali občasna. Glede na količino izločenih beljakovin v urinu ločimo minimalno (pod 300 mg/dan), lahko (pod 1 g/dan), zmerno (pod 3 g/dan) in hudo (nad 3 g/dan) proteinurijo. Z elektroforezo urina ugotavljamo vrsto beljakovine v urinu. Omeniti je potrebno še mikroalbuminurijo, ki

pomeni povečano izločanje albuminov v seču, vendar pa tega ne moremo zaznati s pomočjo preskusnih lističev (normalno se izloča manj kot 30 mg beljakovin v urinu v 24 urah). Gre za zgodnji znak okvare ledvic pri sladkorni bolezni, ugotovimo pa jo lahko tudi pri hipertoničnih, debelih, kadilcih, po fizičnem naporu ali zaužitju alkohola. Glukozo v urinu lahko ugotovimo pri bolnikih s sladkorno boleznijo ali pri ledvični glukozuriji, ki je funkcijska motnja ledvic (krvni sladkor je v mejah normale). V urinu lahko določamo tudi ketonska telesa (pojavi se pri neurejeni sladkorni bolezni, hujšanju itd.), urobilinogen in bilirubin.

Preiskava sečne usedline (sediment) je zelo pomembna pri sumu na bolezen sečil. Potrebujemo 10 do 15 ml svežega urina, ki ga centrifugiramo 5 minut pri 2000 vrtljajih. Usedlino zmešamo z 1 ml urina, celice in druge sestavine štejemo pri veliki povečavi (400-krat). Normalno najdemo v vidnem polju 1 do 3 eritrocite in 3 do 5 levkocitov, razen celic pa najdemo še bakterije, cilindre, maščobe in kristale. Cilindri nastanejo v tubulu, in so nekakšen njegov odlitek. Osnova zanje je Tamm-Horsfalov mukoprotein. Vanj se vključujejo celice in različne snovi (npr. kristali). Ločimo eritrocitne (značilni so za glomerulne bolezni), levkocitne (značilni so za akutni pielonefritis), granulirane (pojavi se pri kroničnih boleznih ledvic, lahko pa tudi po težkem fizičnem naporu), maščobne (najpogosteje ob nefrotskem sindromu) in hialine cilindre (pri napredovali kronični ledvični bolezni). S citološkim pregledom lahko v urinu ugotovimo maligne celice, če obstaja sum na tumor v sečilih. Celice in druge delce lahko opazujemo in štejemo tudi v 1 ml urina (Stansweld-Webbov način) - v 1 ml urina je normalno 7 eritrocitov in do 15 levkocitov.

Bakteriurija pomeni pojav bakterij v urinu. Za ugotavljanje prisotnosti bakterij v urinu je zelo pomembno, da je urin pravilno odvzet, kajti tako preprečimo onesnaženje urina iz zunanjega dela sečil. Bakteriurija je pomembna le, če najdemo v srednjem curku urina več kot 10<sup>5</sup> mikroorganizmov/ml urina. Za dokazovanje bakteriurije je najbolj priznana kvantitativna urinokultura (Sanfordov preskus), ki omogoča ugotavljanje vrste povzročitelja, števila bakterij v 1 ml urina in preizkus občutljivosti povzročitelja na antibiotike in kemoterapevtike. Najhitrejšo informacijo o prisotnosti morebitne pomembne bakteriurije omogoča mikroskopski pregled kaplje svežega, necentrifugiranega urina (čisti odvzem), obarvanega po Gramu. Način je primeren za hitro

oceno uspešnosti zdravljenja. Obstajajo pa še drugi semikvantitativni načini (urikult in podobno) določanja pomembne bakteriurije. (1)

### ***1. 1. 4 Urinarni biomarkerji***

Urin predstavlja idealni vir biomarkerjev, saj ga lahko pridobimo neinvazivno in kontinuirano. Vsaka napaka v delovanju ledvic se bo izražala v sami sestavi urina. Kot primer lahko vzamemo proteine, ki so normalno prisotni v urinu v zelo nizkih koncentracijah. Če se bi količina proteinov povečala, bi lahko sklepali na okvaro glomerula. Ledvice so tudi odgovorne za vzdrževanje acido-baznega ravnovesja ter ravnovesja soli in vode. Kakršnakoli sprememba v teh ravnovesjih je lahko tudi pokazatelj okvare ledvic. Vedno pa moramo paziti na raznorazne diete, ki lahko same po sebi spremenijo lastnosti urina.

#### 1) Pokazatelji ledvične okvare so lahko encimi:

Najbolj uporabni encimi se nahajajo v celicah proksimalnega tubula, ki je najbolj dovzeten za toksične poškodbe. Ti encimi so: alanin aminopeptidaza, alkalna fosfataza,  $\beta$ -galaktozidaza... Posledica toksičnih snovi je poliurija in počasno naraščanje N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaze v urinu.

#### 2) Metabolni urinarni biomarkerji:

Odkrili so veliko novih potencialnih biomarkerjev, kot npr. urinarni kreatin, ki naraste pri poškodbah testisov, urinarna tiosečnina (naraste zaradi jetrne poškodbe).

#### 3) Tiosečnina v urinu:

S pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije lahko ločimo tiosečnino od ostalih aminokislin v urinu. In vivo študije na podganah so pokazale, da veliko hepatotoksičnih substanc, kot npr. CCl<sub>4</sub>, galaktozamin in tioacetamid, ki povzročajo nekrozo jeter, in hidrazin ter etionin, ki povzročata steatozo, povzročajo dvig nivoja tiosečnine v urinu. Za vse te substance je znano da zavirajo sintezo proteinov, kar pa bo povečalo sintezo tiosečnine in prebitna tiosečnina se bo izločala v urin. Nivo tiosečnine v urinu je pomemben potencialni biomarker pri biokemičnih poškodbah povzročenih s kemikalijami, še posebej pri spremembah v sintezi proteinov in GSH.

#### 4)Merkapturna kislina

Elektrofilne spojine ali intermediati lahko spontano ali encimatsko (s pomočjo encima glutation S- transferaze) reagirajo z glutationom. Nastanejo konjugati z glutationom, iz katerih nastane merkapturna kislina. Biološka razpolovna doba je relativno kratka, zato se uporablja kot neinvaziven pokazatelj toksičnosti predvsem pri kemikalijah, uporabljenih v industrijske namene, kot so: etilenoksid, iz katerega nastane 2-hidroksietil merkaptoletanol, akrolein, ki se pretvori v 3-hidroksiprofilmerkapturno kislino ter metilformamidi in metilizocianati, ki se pretvorijo v N-metilkarbamoilmerkapturno kislino.

### ***1. 1. 5 Kovine – vpiv na ledvice***

Ledvice so eden izmed glavnih tarčnih organov za težke kovine in različne organske spojine, ki se lahko akumulirajo v ledvicah, in s tem povzročajo poškodbe predvsem v tubulnem delu ledvic, lahko pa tudi na glomerulih. Glomerulno funkcijo ledvic ocenimo z določanjem visokomolekularnih beljakovin v urinu (albumin, IgG), tubulno funkcijo pa ocenimo z merjenjem nizkomolekularnih beljakovin v urinu ( $\alpha$ -1-mikroglobulin,  $\beta$ 2-mikroglobulin in retinol-vezoči protein). Pri poškodbah ledvic je prepustnost glomerulov in/ali tubulov večja, in zaradi tega se izloči v urin več plazemskih beljakovin kot običajno. Težke kovine imajo višjo afiniteto do skupin, ki vsebujejo –SH, OH, COOH, NH<sub>2</sub>, in z njimi tvorijo komplekse ali pa potečejo direktne kovalentne reakcije.

**Cd:** -akumulira se v ledvicah, predvsem v ledvični skorji in jetrih, kjer se veže na nizkomolekularni protein metalotionin. Izloča se predvsem skozi ledvice. Kadmij v urinu odraža količino kadmija v ledvicah.

**Pb:** -nefropatije (kompleksi z epitelijem)

**As:** -poškodba epitelija na ledvicah; tubularna nekroza (hematurija, proteinurija)

**Hg:** -patološke spremembe na ledvicah;



### **1. 1. 6 Bolezni ledvic**

*Hidronefroza* – zapora sečevodov povzroči zastajanje urina, ki pritiska na ledvično tkivo okoli ledvičnega meha tako, da se ledvični meh razširi, ledvično tkivo pa stanjša. Vzroki zapore so brazgotine, sečni kamni, novotvorbe, povečanje obsečnice pri starejših moških, prirojene spremembe sečnega mehurja in sečnice ter zožanje sečnice.

*Analgetična nefropatija* - nastane zaradi prekomernega uživanja zdravil, ki lajšajo bolečine. Ledvice so občutljive na različne strupe, ker se vsi strupi, ki jih najdemo v krvi, v ledvicah kopičijo in izločajo skozi ledvice. Najbolj toksična snov v tabletah proti bolečinam je fenacetin. Ledvice poškoduje tudi aspirin. Obe zdravili po nekaj letih rednega in pretiranega uživanja povzročita vnetje in nekrozo ledvičnih papil, ki se izločijo s sečem. Bolniki imajo krvav urin, ledvične kolike in pogoste okužbe sečil. (3)

*Glomerulonefritis* - je vnetje obeh ledvic, ki se začne v glomerulu ali kapilarnem klobčiču. Prvi znak je proteinurija in hematurija. (3)

*Kronični pielonefritis* - je kronično vnetje ledvice. Pojavlja se pogosto in brez izrazitih znakov in simptomov, dokler ne povzroči ledvične odpovedi. Občasna bakteriurija, levkociti v sečni usedlini, pogosto mokrenje, nočno mokrenje, povečan krvni tlak spremljajo to počasi potekajočo bolezen. Obolela ledvica je nepravilne oblike, sfrknjena, zabrazgotinjena, v ledvičnem tkivu so številne vnetne celice kroničnega vnetja (limfociti, plazmatke). (3)

*Policistična bolezen ledvic* - je obolenje ledvic s številnimi cistami v ledvicah. Ciste rastejo in pritiskajo na zdravo ledvično tkivo. Ledvica je povečana zaradi cist, ki so napolnjene z bistro tekočino. Bolezen je dedna, napreduje počasi in privede do odpovedi ledvic, navadno v četrtem desetletju starosti. (3)

*Diabetes* - Sladkorna bolezen je najpogostejši vzrok končne ledvične odpovedi. Ledvice so občutljivejše za nastanek ledvične bolezni in začnejo prepuščati majhno količino albumina. To je sicer beljakovina v telesu, ki se izloči v urinu v zelo majhni količini, določimo pa jo lahko s posebnimi metodami.

Mikroalbuminurija naznanja razvoj ledvične okvare zaradi sladkorne bolezni. Na voljo so zdravila, ki učinkovito znižajo krvni tlak in preprečijo izgubljanje albumina preko ledvic, in tako v zgodnjem obdobju preprečijo nastanek ledvične okvare zaradi sladkorne bolezni. Vzdrževanje normalne koncentracije sladkorja v krvi je ključnega pomena tudi za preprečitev ledvičnih bolezni.

### ***1. 1. 7 Preiskave pri bolniku z ledvično boleznijo***

#### Laboratorijske preiskave urina

Urin zdravega človeka je bister in nekoliko rumenkast.

#### Proteinurija

Zdrav človek izloči dnevno do 150 mg beljakovin v urinu. Beljakovine sestavljajo predvsem albumini in Tamm-Horsfallove beljakovine (te beljakovine izločajo distalne zavite cevčice). Proteinurija je izločanje več kot 150 mg beljakovin dnevno v urinu. Najbolj preprosta metoda določanja količine beljakovin v urinu je preizkus s testnimi lističi (Albustix). Po tej metodi so odčitki včasih nepravilni, ker se količina beljakovin v urinu dnevno spreminja. Pri ženskah je urin lahko pomešan z nožničnimi izločki. Natančne preiskave so tisti načini, ki določajo beljakovine iz zbranega celodnevne urina. Stalna proteinurija je zanesljiv znak okvare glomerulne filtracijske membrane (glomerulna filtracijska membrana je sestavljena iz epitelnih celic, bazalne membrane in endotelnih celic), ki postane povečano prepustna za beljakovine plazme. Izločanje albuminov v seču je pogosto pri glomerulonefritisih. Bolnik z nefrotičnim sindromom izloči dnevno več kot 3,5 g beljakovin z urinom. Blage proteinurije spremljajo predvsem kronične okužbe sečil. (3)

Hematurija je prisotnost krvi v urinu. Hematurija spremlja številne bolezni (glomerulonefritis, kamni, okužbe, novotvorbe sečil, poškodbe sečil). Testni lističi so hiter in dober način ugotavljanja krvi v urinu. (3)

#### pH urina

Pri zdravem človeku je pH urina med 4,5 in 8,0, povprečno pa je kisel (okoli 6,0). Uživanje mesa povzroči izločanje kislega urina, vegetarijanska prehrana pa povzroči alkalen urin. Bolniki z acidozo in vročino izločajo kisel urin. Okužbe z nekaterimi bakterijami povzročijo alkalnost urina. (3)

## 1. 2 TEŽKE KOVINE

Določene snovi in materiali povzročajo v naravi in s tem tudi človeku velike obremenitve, ki se kažejo kot najrazličnejše oblike zastrupitev. Med temi so najpogostejše zastrupitve s težkimi kovinami, ki delujejo na pomembnih mestih regulacije našega telesa in tako delujejo na številne procese presnove ter telesne funkcije. Posledice zastrupitve z omenjenimi težkimi kovinami so številne motnje živčnega sistema, srčne težave (kardiomiopatije neznanega vzroka), različne kronične bolezni in rakasta obolenja.

Poznano je, da težke kovine povzročajo v živem organizmu tvorbo prostih radikalov, ki povzročajo številne poškodbe na organskem nivoju. Človeški in živalski organizem imata na voljo številne obrambne in reparaturne mehanizme za popravilo nastalih poškodb. Težke kovine delujejo negativno prav na reparaturne mehanizme in blokirajo njihovo delovanje ter tako povečajo škodljivo delovanje predvsem s sproščanjem prostih radikalov in negativnimi vplivi na celično dihanje. Različne težke kovine lahko na istem organu povzročajo poškodbe, kjer se učinki posameznih težkih kovin še povečujejo, zaradi kumulativnega učinka. Iz toksikologije težkih kovin so poznani učinki nastajanja prostih radikalov, poškodb različnih encimov, poškodb celične presnove, genetske okvare, poškodbe imunskega sistema, živčnih celic (mielinska ovojnica), pretoka krvi in spolnih organov. Iz toksikologije so poznani učinki in mehanizmi škodljivega delovanja težkih kovin, zaradi česar so natančno določene mejne vrednosti, ki jih lahko zaužije človek ali žival.

### *1. 2. 1 Mehanizem delovanja težkih kovin*

Glavni mehanizem toksičnega delovanja težkih kovin v organizmu je tvorba biološko aktivnih prostih radikalov, katerih polovični čas obstoja se meri v mikro sekundah. To pomeni, da imajo prosti radikali sposobnost v nekaj milijoninkah sekunde reagirati z okolnimi molekulami, in tako povzročiti poškodbe celičnih membran. Posledica je verižna reakcija, med katero nastaja neizmerno število prostih radikalov, ki povečujejo škodljivo delovanje na celične membrane.

Prosti radikali nastanejo tudi pri delovanju visokoenergijskih žarkov (radioaktivni, UV, rentgenski), kajenju, uživanju različnih zdravil, delovanju strupov v okolju, pri delovanju ozona v zraku in pri nepravilni prehrani.

Glavno mesto delovanja prostih radikalov so mitohondriji, celični organeli, v katerih se proizvaja energija za opravljanje celičnih funkcij. Pri poškodbi mitohondrijev se upočasnijo celična presnova in s tem vsi procesi, vključno izločanje celičnih odpadnih produktov, ki se kažejo v pospešenem staranju celic z znaki utrujenosti, motnjami v spominu in pešanju vida in sluha. Poleg tega so energijsko oslABLJENE celice občutljivejše na delovanje drugih škodljivih dejavnikov, nekontrolirano delitev in prezgodnjo celično smrt.

### ***1. 2. 2 Poškodba mitohondrijev***

Težke kovine se v telesu vežejo na žveplove skupine ali druga mesta vezave v beljakovinah, encimih, koencimih in celičnih membranah. Težke kovine vezane na beljakovine prispejo po krvi do različnih organov, kjer lahko spremenijo električni naboj, spremenijo prepustnost celične stene in delujejo na celične procese ter povzročajo poškodbe ali smrt celice. Težke kovine so v maščobah topne, in se lahko hitro resorbirajo v organe bogate z maščobo, preidejo krvno - možgansko zaščito in se odložijo v možganih, kjer delujejo na živčne celice, beljakovine in encime. Težke kovine povzročajo znotraj celice poškodbe različnih celičnih delov, kot so mitohondriji (energijske centrale celice) ali celično jedro z dednimi informacijami.

Mitohondriji so z maščobami bogati celični deli z dvojno celično membrano in lastno DNK, in vsebujejo encime dihalne verige ter citratnega ciklusa. Njihova naloga je proizvodnja energije iz različnih hranilnih snovi v celici ter tvorba izhodnih snovi za važne spojine, kot so amino kisline, fosfolipidi, krvna barvila, potrebni za vzdrževanje normalnih telesnih funkcij. Poleg tega mitohondriji tvorijo najvažnejši vir energije v obliki ATP (adenozin fosfat). Poškodbe mitohondrijev imajo za posledico zmanjšano produkcijo energije in fizioloških funkcij celice, upočasnjeno obnavljanje telesnih tkiv in organov ter hitrejše staranje celice.

Na telesnem nivoju se poškodbe mitohondrijev kažejo v oslabeledosti mišičnega aparata, srčne mišice, staranju kože, zmanjšanju sposobnosti čutil (vida, sluha itd), poškodbah sten ožilja s posledičnimi motnjami v prekrvavitvi in povišanemu krvnemu tlaku, nadalje v

staranju skeleta oz. kostnega tkiva, spremembah sklepov, zmanjšani sposobnosti razstrupljevalnih organov ledvic in jeter, povečanju prostate itd.

Težke kovine lahko delujejo škodljivo tudi na druge celične dele ali organele, kar je pogosto pri obremenitvi organizma z večjim številom težkih kovin, ki delujejo istočasno na različnih mestih. Poškodbe se lahko kažejo na celičnem, organskem ali na nivoju celotnega organizma.

Tako lahko živo srebro poškoduje celično membrano, mitohondrije in lizosome tako živčnega, imunskega sistema in srca ter ožilja. Delovanje živega srebra se lahko potencira še z obremenitvijo organizma s svincem, niklom, kadmijem, železom, bakrom in aluminijem ter drugimi kovinami, ki so istočasno prisotne v organizmu. Delovanju kovin se lahko pridruži delovanje kemičnih sredstev v celici in medceličnem prostoru, konzervansov, herbicidov, pesticidov in številnih drugih snovi s škodljivim delovanjem na celične funkcije, kot je poškodba Natrij-Kalijeve črpalke v celični steni. Poškodba Natrij-Kalijeve črpalke, ki je odgovorna za vzdrževanje ravnotežja elektrolitov, sladkorja in amino kislin in s tem normalne celične funkcije različnih organov (srca, jeter, slinavke), vodi do zastoja natrija v celici in omejenega transporta življenjsko važnih snovi, kot so sladkor in beljakovine v celici.

Težke kovine lahko delujejo na stene lizosomov, ki hranijo številne encime za razgradnjo odvečnih ali neuporabnih hormonov. Lizosomi tako prispevajo k uravnoteženemu stanju in delovanju hormonov. Poleg tega imajo lizosomi sposobnost akumuliranja težkih kovin in s tem zaščito preostalega notranjega celičnega prostora. V primeru prevelike koncentracije težkih kovin in poškodbe stene lizosomov lahko pride do sproščanja lizosomalnih encimov v notranjosti celice in posledične poškodbe in razpada celice.

### ***1. 2. 3 Motnje imunskega sistema***

Težke kovine delujejo v smislu zmanjševanja tvorbe belih krvnih teles, zmanjšujejo gibljivost t.i. fagocitnih celic, blokirajo oz. zavirajo reparaturne encime v celičnem jedru, povzročajo nastajanje avto protiteles, motijo prenašanje informacij v imunskem sistemu ter povzročajo večjo nagnjenost k različnim vnetnim reakcijam organizma.

### ***1. 2. 4 Vpliv na specifično imunost***

V raziskavah so ugotovili, da imajo težke kovine, kot je živo srebro, že v majhnih koncentracijah negativen učinek na aktivnost celic ubijalk. Tudi pri kronični obremenitvi s svincem se zmanjša aktivnost imunskega sistema s posledičnim zmanjšanjem fagocitnih in limfocitnih celic. Pri obremenjenosti z arzenom pride do odmiranja limfocitov in oslabitve imunskega sistema.

Citokini prenašajo informacije delovnih celic na preostale celice imunskega sistema, da bi delovale v obrambi pred škodljivimi klicami in rakastimi celicami. Citokini regulirajo reakcijo imunskega sistema telesa na povzročitelje bolezni ali druge škodljive snovi iz okolja. Težke kovine lahko povzročijo nepravilno nastajanje citokinov in posledično zmanjšanje delovanja imunskega sistema.

Za težke kovine je znano, da delujejo negativno na celice imunskega sistema. Poznan je primer arzena, ki povzroča celično smrt limfocitov in s tem oslabitev imunskega sistema. Svinec deluje na zmanjšano nastajanje B- in T-limfocitov ter naravnih celic ubijalk, kar povzroča vnetne procese ali celo rakasto obolenje. Za kadmij je poznano, da deluje na povišano produkcijo imunoglobulinov E, protiteles in citokinov, kar povečuje pojav alergičnih reakcij. Živo srebro neposredno deluje na zmanjšano nastajanje T-supresorskih celic in naravnih killer celic.

## **1. 3 ŽIVO SREBRO (Hg)**

### ***1. 3. 1 Oblike in nahajanje***

Glede na toksičnost so pomembne tri kemijske oblike:

- elementarna oblika (pare živega srebra),
- soli živega srebra in
- organske živosrebrove spojine.

Od anorganskih oblik kovine je elementarno živo srebro najbolj hlapno. Zastrupitev se pogosto pojavi v raziskovalnih laboratorijih, kjer smo po nenamernem razlitju živega srebra lahko zaradi slabega pretoka zraka izpostavljeni param kovine. Pare živega srebra se lahko sprostijo iz srebro-amalgamskih zobnih zalivk. (4) Soli živega srebra se nahajajo

v dveh oksidacijskih stanjih- monovalentnem in divalentnem. Živosrebrov (I) klorid, kalomel,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , se je uporabljal v nekaterih kremah za kožo kot antiseptik, deluje pa tudi diuretično in odvajalno. Soli živega srebra so najbolj dražljiva toksična oblika kovine. Živosrebrov (I) nitrat,  $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ , je bila snov, s katero so se zastrupljali v industriji klobučevine pred več kot 400 leti. (4) Poklicna izpostavljenost kovini povzroči nevrološke spremembe in vedenjske motnje. Živosrebrov klorid je bil pogosto uporabljen v samomorilске namene.

### ***1. 3. 2 Mehanizem toksičnosti***

Živo srebrovi ioni delujejo toksično zaradi obarjanja proteinov, inhibicije encimov in generaliziranim korozivnim delovanjem. Živo srebro se veže s SH skupino, kot tudi s fosfatno, karboksilno, amidno in amsko skupino. Kovina reagira z mnogimi encimi in proteini, ki vsebujejo te skupine, in vpliva na encimske reakcije v celici. Tudi v nizkih koncentracijah so živosrebrove spojine sposobne inaktivirati encime, ki vsebujejo SH-skupine. Tako motijo celični metabolizem in funkcijo. (5)

### ***1. 3. 3 Vnos v telo in izločanje***

Peroralno zaužitje živega srebra v elementarni obliki ni nevarno zaradi zelo majhne absorpcije iz prebavil (0,01 odstotka). (6) Če smo izpostavljeni param živega srebra, pride do popolne absorpcije preko pljuč, v eritrocitih pa poteče oksidacija pod vplivom katalaze do divalentnega živosrebrovega kationa. (4)

Topne anorganske soli ( $\text{Hg}^{2+}$ ) vstopijo v krvni obtok, če jih zaužijemo peroralno. Absorpcija iz prebavil je 10-odstotna in znaten delež  $\text{Hg}^{2+}$  lahko ostane vezan na sluznico prebavne cevi. (4) Anorgansko živosrebro ima po absorpciji izrazito neenakomerno distribucijo. Največjo koncentracijo  $\text{Hg}^{2+}$  najdemo v ledvicah, kjer kovina ostane dlje, kot pa v ostalih tkivih. Kovina se izloča v urin in blato z razpolovno dobo 60 dni. (4)

Organske živosrebrove spojine se bolje absorbirajo iz prebavil kot anorganske soli, ker so bolj topne v lipidih, in se malo vežejo na sluznico prebavne cevi. Več kot 90 odstotkov metil živega srebra se absorbira iz prebavil. (6) Organske živosrebrove spojine prehajajo krvno-možgansko bariero in placento, in tako povzročajo več nevroloških in teratogenih

efektov kot anorganske soli. Organske živosrebrove spojine so bolj enakomerno porazdeljene v različnih tkivih kot anorganske soli. Pomemben delež telesnih zalog organskih živosrebrovih spojin je v rdečih krvnih celicah. (4) Živo srebro se nalaga v lase, ker je tam veliko SH skupin. Metil živo srebro se v glavnem izloča z blatom konjugiran z glutationom. Razpolovna doba metil živega srebra v krvi je 40-105 dni.

### ***1. 3. 4 Klinična slika***

Akutna izpostavljenost param elementarne oblike živega srebra povzroči simptome v nekaj urah. Značilni simptomi so slabotnost, mrzlica, kovinski okus v ustih, slabost, bruhanje, diareja, težko dihanje, kašljanje, stiskanje v prsih. Lahko se razvije pnevmonitis s hudo poškodbo respiratorne funkcije. Po detoksikaciji ostanejo na pljučih fibrozna mesta. Kronična izpostavljenost param živega srebra povzroči obliko toksičnosti, pri kateri prevladujejo nevrološki efekti. Z nadaljnjo izpostavitvijo param živega srebra se pojavi tremor in psihološke spremembe, ki vključujejo depresijo, razdražljivost, prekomerno plahost, nespečnost, zmanjšano samozavest, čustveno nestabilnost, pozabljivost, zmedenost, nestrpnost. Pogosto se pri zastrupitvah s parami živega srebra pojavi močno slinjenje in vnetje dlesni. (6)

Živosrebrove soli obarjajo sluznične proteine, in rezultat je sivo pepelnata barva sluznice v ustih, žrelu in črevesu. Povzročajo tudi hude bolečine in bruhanje, ki pa je lahko varovalno, ker odstrani neabsorbirano živo srebro. Rezultat lokalnega učinka na prebavno sluznico je luščenje sluznice. Neprimerno zdravljenje se lahko konča s smrtjo. Sistemska toksičnost se začne v nekaj urah po stiku s kovino in traja nekaj dni. Najbolj resen in pogost sistemski efekt anorganskega živega srebra je renalna toksičnost.

Po kratkotrajni izpostavitvi se pojavi nekroza renalnih tubulov, kar vodi v oligurijo ali anurijo. Pri kronični izpostavljenosti anorganskim živosrebrovim ionom se pogosto pojavi akrodinija(rožnata bolezen, s katero so značilne bolezni v okončinah, motnje delovanja ožilja, roza izpuščaji na prstih rok in nog, rožnata stopala, potenje...) Domnevamo, da se akrodinija pojavi izključno po zaužitju živega srebra, in da je rezultat hipersensitivne reakcije na kovino. (4)



Simptomi izpostavitve metil živemu srebru so predvsem nevrološki: motnje vida, ataksija (motena usklajenost mišičnih gibov), izguba sluha, tresenje, motnje v gibanju, sčasoma nastopi paraliza dihalnih mišic in smrt.

### ***1. 3. 5 Teratogenost in kancerogenost***

Po podatkih CDC (ang. Centers for Disease Control and Prevention; Center za nadzor bolezni in preventivo) ima kar osem odstotkov nosečnic ob rojstvu otroka v krvi preveč živega srebra. Tudi pri zdravo rojenih otrocih je večja verjetnost, da bodo imeli težave z učenjem. Ameriška FDA (uprava za hrano in zdravila) je obvestila javnost oziroma bodoče matere, naj bodo pri uživanju tune previdne. Ugotovili so, da je v tuninih konzervah veliko živega srebra, ki lahko škoduje razvoju še nerojenega otroka. Negativno vpliva na razvoj možganskega tkiva. Še več živega srebra kot tuna vsebujejo morski pes, kraljeva skuša in mečarica. Teh rib nosečnice po mnenju FDA sploh ne bi smele uživati. (7) Zaradi negativnih rezultatov preiskav kancerogenosti živega srebra pri človeku in nezadostnimi dokazi pri živalih, sta ACGIH (ang. American Conference of Governmental Industrial Hygienists; Ameriška konferenca državnih industrijskih higienikov) in EPA (United States Environmental Protection Agency; ameriška agencija za varstvo okolja) uvrstili živo srebro v skupino snovi, ki ni kancerogena za človeka. (8)

### ***1. 3. 6 Biološki indikatorji***

Ker se metil živo srebro koncentrira v eritrocitih, anorgansko živo srebro pa ne, lahko porazdelitev vsega živega srebra med rdečimi krvnimi celicami in plazmo kaže na to, ali se je pacient zastrupil z anorganskim ali organskim živim srebrom. Merjenje totalnega živega srebra v rdečih krvnih celicah daje boljšo oceno telesne zaloge metil živega srebra, kot pa za anorgansko živo srebro. Koncentracija živega srebra v plazmi je boljši pokazatelj telesne zaloge anorganskega živega srebra. Za ugotavljanje telesne zaloge kovine se uporablja tudi koncentracija živega srebra v urinu.

Zveza med plazemsko koncentracijo in izločanjem kovine v urin, po izpostavitvi param kovine, je linearna. Izločanje živega srebra v urin je slab pokazatelj količine metil živega srebra v krvi.(4)

### **1. 3. 7 Laboratorijska diagnostika**

Koncentracijo živega srebra ugotavljamo z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo.(9) Živo srebro analiziramo v polni krvi, odvzeto z EDTA ali heparinom in v urinu, ki ga zbiramo 24 ur, potrebno pa je določiti tudi količino zbranega urina. V krvi je večina živega srebra vezanega na eritrocite, malo pa na proteine, zato je koncentracija v polni krvi signifikantno večja in bolj koristen podatek kot koncentracija kovine v plazmi.

referenčne vrednosti (9)

polna kri < 7.2 µg/L

urin < 26.4 µg/L

< 38.9 µg/g kreatinina

### **1. 3. 8 Zdravljenje**

Za zdravljenje zastrupitev z anorganskim ali organskim živim srebrom se uporablja terapija s kelati, z dimerkaprolom ali penicilaminom. Čas zdravljenja je različen, napredek pa lahko nadzorujemo s spremljanjem koncentracije živega srebra v urinu in krvi.(4)

Organske živosrebrove spojine s kratko verigo, posebno metil živo srebro, se zelo težko odstranijo iz telesa, verjetno zaradi slabe reakcije s kelati.

## **1. 4 SVINEC (Pb)**

### **1. 4. 1 Oblike in izpostavljenost**

Glavni vir izpostavljenosti svincu pri ljudeh je hrana. Kisla hrana in pijača, vključno z paradižnikovim sokom, sadnim sokom, jabolčnikom, lahko raztopijo svinec, če so shranjeni v neprimernih steklenih posodi, saj lahko nekatere vrste stekla vsebujejo to kovino. Pred drugo svetovno vojno sta se svinčev oksid (rdeč) in svinčev karbonat (bel) pogosto uporabljala kot sestavini barv, ki so jih uporabljali za zunanjo in notranjo obdelavo hiš. Otroci se lahko v starejših hišah zato zastrupijo z grizljanjem prijetno

sladkih delcev take barve, nevaren pa je tudi prah, ki se npr. nabira na okenskih policah prebarvanih s to barvo. En majhen delec barve iz starega bivališča lahko vsebuje do 100 mg svineca.(5) Pri prenovah in rušitvah starih hiš moramo zato biti posebno pozorni, saj nastajajoči prah in dim predstavljata nevarnost za kontaminacijo okolja s svincem. Vir zastrupitev s svincem je onesnaženo ozračje z izpušnimi plini, na delovnih mestih v kemični industriji, lončarstvu, livarstvu in varilstvu. Pozornost pa je potrebno nameniti tudi ovojem bonbonov in prehranskim embalažam, saj so v neposrednem stiku z živilom (10):

- Ovojni papir (darilni papir) vsebuje do 10 g svineca/kg.
- Prehranska embalaža (polietilenske plastične vrečke) vsebuje do 20 mg svineca/kg.
- Ovoji bonbonov in žvečilnih gumijev vsebujejo do 88 mg svineca/kg.

Svinec se nahaja se v dveh oksidacijskih stanjih: +2 in +4.

### ***1. 4. 2 Mehanizem toksičnosti***

Svinec izkazuje toksičnost z vezavo na SH skupine proteinov, kar inaktivira več pomembnih encimskih sistemov. Svinec povzroči strukturne in funkcionalne spremembe mitohondrijev v celicah. Svinec vpliva na sintezo hema. Zaradi zmanjšane sinteze hema se v kostnem mozgu poveča produkcija eritrocitov. Te celice se izločijo kot nezreli retikulociti.(5, 6)

### ***1. 4. 3 Vnos v telo in izločanje***

Glavne poti vnosa svineca v telo so prebavila in dihalni sistem. Absorpcija preko prebavil varira glede na starost. Odrasli absorbirajo 5 do 15 odstotkov vnesenega svineca, medtem ko imajo otroci večjo absorpcijo kot odrasli, in absorbirajo do 40 odstotkov vnesenega svineca. (6) Absorpcija je pri otrocih povezana s starostjo in razvojem prebavne cevi. Transport svineca preko sluznice prebavil še ni dodobra razjasnjen. Predpostavlja se, da naj bi  $Pb^{(2+)}$  in  $Ca^{(2+)}$  tekmovala za skupni transportni mehanizem. Deficit kalcija poveča absorpcijo svineca. Prav tako na absorpcijo vpliva tudi nivo železa: ob pomanjkanju le-tega naj bi bila absorpcija svineca iz prebavil povečana. Preko dihal se absorbira približno 90 odstotkov svineca iz okolja. (4) 99 odstotkov absorbiranega svineca se v krvi veže na

hemoglobin in eritrocite, le 1 do 3 odstotka svinec v krvi je na voljo tkivom. (4) Anorganski svinec se najprej porazdeli v mehka tkiva, predvsem v jetra in epitelij ledvičnih tubulov. S časoma se prerazporedi in shrani v kosti, zobe in lase. Pb, ki se porazdeli v kostno maso, je netoksičen, razen toliko, da kostna masa ni tako trdna kot pri Ca. Majhne količine anorganskega svinec se kopičijo v možganih, večina v sivi možganovini in bazalnih ganglijih. Velik vnos fosfatov poveča zalogo svinec v kosteh in zniža koncentracijo v mehkih tkivih. Paratireoidni hormon in dihidrotahisterol prenašata svinec iz kosti in povečata koncentracijo svinec v krvi in stopnjo izločanja le-tega v urin. Pri človeku izločanje z urinom predstavlja pomembnejšo pot izločanja svinec iz organizma, poleg tega pa je koncentracija svinec v urinu proporcionalna koncentraciji le-tega v plazmi. Ker pa je svinec v krvi vezan na eritrocite, se ga zelo malo filtrira. Lahko se izloča tudi z mlekom in znojem, nahaja pa se še v lasih in nohtih, prehaja pa lahko tudi placento. Razpolovna doba svinec v krvi je en do dva meseca. Razpolovna doba v kosteh, kjer njegova koncentracija s časom narašča, je 20 do 30 let. (4)

#### ***1. 4. 4 Klinična slika***

Akutna zastrupitev s svincem je sorazmerno redka, in se pojavi pri vnosu svinčevih spojin, ki so topne v kislinah ali vdihavanju svinčevih par. V ustih se pojavi kovinski okus in žeja. Sledi slabost, bolečine v trebuhu in bruhanje. Zaradi prisotnosti HCl v želodcu nastane svinčev klorid,  $PbCl_2$ , in izbljuvana tekočina je zato belkaste barve. Zaradi svinčevega sulfida je feces lahko črn. Pojavi se diareja ali zaprtje. Zaradi izgube telesnih tekočin in elektrolitov nastopi šok. Vpliv na centralni živčni sistem se kaže kot parestezije (mravljinčenje), bolečine in delna ohromljenost. Pojavi se huda anemija in hemoglobinurija. Ledvice so poškodovane, vidna je oligurija in sprememba v sestavi urina. Smrt nastopi v enem do dveh dneh, če ne pomagamo. (4, 11, 12)

Znaki in simptomi kronične zastrupitve s svincem se kažejo v različnih sistemih v telesu: prebavila, nevromuskularni sistem, CŽS, kri, ledvica in ostali. Simptomi se lahko pojavijo posamezno ali v kombinaciji. Učinki na centralni živčni sistem so bolj pogosti pri otrocih, gastrointestinalni sindrom pa je bolj razširjen pri odraslih.

- *Prebavila*: učinkuje na gladke mišice črevesja in tako povzroči simptome, ki so pomembni, zgodnji znaki prekomerne izpostavljenosti kovini. Abdominalni sindrom se

pogosto začne z anoreksijo, mišičnimi težavami in glavobolom. Pomemben znak je tudi kovinski okus, ki se ga ne moremo znebiti. Z napredovanjem intoksikacije anoreksija in zaprtost postajata vse bolj očitni.

- *Nevromuskularni efekti*: Nevromuskularni sindrom (svinčeva ohromelost) je precej redek. Edina simptoma sta lahko mišična slabost in utrujenost, pojavita pa se lahko precej pred paralizo.

- *Efekti na centralni živčni sistem*: Sindrom CŽS so poimenovali svinčeva encefalopatija. Predstavlja najresnejši izraz zastrupitve s svincem, in je pri otrocih precej bolj pogost kot pri odraslih. Zgodnji znaki sindroma so lahko okornost, vrtoglavica, ataksija, glavobol, nespečnost, nemir in razdražljivost. Razvijejo se tudi motnje vida. (4) Izpostavljenost svincu lahko pri otrocih zavre normalen mentalni razvoj. V prvih 12 do 18 mesecih pri teh otrocih opazimo normalen razvoj, kasneje pa pride do izgube motoričnih sposobnosti in govora ter do agresivnega obnašanja. Večina otrok je kronično izpostavljena nizkim stopnjam svınca v njihovi prehrani, v zraku, ki ga dihamo, v umazaniji in v prahu. (4)

- *Ledvice*: Čeprav so učinki svınca na ledvice manj dramatični, kot njegovi učinki na prebavila in CŽS, se pojavi nefropatija. Renalna toksičnost se pojavlja v dveh oblikah:

- reverzibilna okvara renalnih tubulov (navadno pri otrocih pri akutni izpostavitvi svincu) in

- ireverzibilna nefropatija (navadno pri dolgotrajni izpostavljenosti, npr. v industrijah).

Klinično opazimo Fanconijev sindrom s proteinurijo in hematurijo. (4)

- *Kri*: Ko koncentracija svınca v krvi doseže 80 µg/dl ali več, se v eritrocitih pojavijo bazofilne punktacije (agregacija ribonukleinske kisline). (4) Bolj pogost hematološki dokaz kronične zastrupitve s svincem je hipokromna mikrocitna anemija, ki se pogosteje pojavi pri otrocih, in je morfološko podobna anemiji, ki se pojavi zaradi pomanjkanja železa.

#### ***1. 4. 5 Teratogenost in kancerogenost***

EPA je klasificirala svinec v skupino kancerogenov, ki domnevno povzročajo raka pri človeku. Zaradi toksikokinetičnih razlik med vrstama, kljub dokazom kancerogenosti svınca na živalih, ne moremo klasificirati kovino kot kancerogeno za človeka. (8)

### **1. 4. 6 Biološki indikatorji**

Znaki in simptomi zastrupitve s svincem so podobni kot pri nekaterih drugih boleznih. Sum na zastrupitev s svincem lahko potrdimo z ugotavljanjem koncentracije svinca v krvi in urinu. Nizke koncentracije svinca zmanjšajo sintezo hema v več stopnjah. Diagnostično pomembni substrati so  $\delta$ -ALA, koproporfirin (oba merimo v urinu, kjer dokažemo zvišane vrednosti) in cinkov protoporfirin (merimo v eritrocitih, kot eritrocitni protoporfirin, kjer tudi dokažemo zvišane vrednosti). Vnašanje svinca v telo spremljamo z določanjem koncentracij svinca v krvi.

### **1. 4. 7 Laboratorijska diagnostika**

Koncentracijo svinca ugotavljamo z atomsko absorpcijsko spektroskopijo, z uporabo kivete z grafitno površino za disociacijo pri visoki temperaturi.

- *Eritrocitni protoporfirin* analiziramo s spektrofluorimetrijsko metodo, saj porfirini v kislem mediju pod ultravijolično svetlobo fluorescirajo z maksimumom pri 590 in 700 nm.
- *Porfirine* v urinu ločimo na frakcije s tankoplastno kromatografijo na osnovi zaporedja verige za biosintezo hema. Frakcije nato izmerimo fluorimetrično, ker pod ultravijolično svetlobo porfirini fluorescerajo (366 nm), ali spektrofotometrično.  *$\delta$ -ALA* analiziramo z ionsko izmenjevalno kromatografijo s kombinirano dvojno kolono.
- *Polna kri*: zbiranje vzorca zahteva uporabo materialov, ki ne vsebujejo svinca (plastična ali kapilarna cevka); priporočen antikoagulant je heparin, natrijev citrat ali natrijev oksalat. Serum ni primeren, ker je večji del svinca v krvi vezanega na eritrocite. Za določanje eritrocitnega protoporfirina potrebujemo eritrocite iz heparinizirane krvi.
- *24-h urin*: vzorec za določanje svinca se zbira v plastično posodo, ki smo jo izprali s HCl(2 M); izmerimo volumen urina, za analizo pa ga uporabimo najmanj 10 ml.

Za analitiko porfirinov v urinu mora le-ta biti med zbiranjem zaščiten pred svetlobo in shranjen na hladnem; če je mogoče, v hladilniku pri 4 do 8°C.

referenčne vrednosti (9)Svinec ( $\mu\text{g/L}$ )

	normalno	povečano	toksično
Kri	50 - 270	700 – 1000	> 1000
Eritrociti	120 - 450		
24-h urin	3-18	150-250	> 250

**1. 4. 8 Zdravljenje**

Diazepam uporabimo za zdravljenje mišičnih krčev, uravnati je potrebno elektrolite in vodo v organizmu, edeme v možganih pa zdravimo z diuretiki. Pri zdravljenju s kelati se uporabljajo kalcij dinatrijev EDTA ( $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ ), dimerkaprol, penicilamin in sukcimer. Zdravljenje zastrupitve z organskim svincem je simptomatsko. (4, 5)

**1. 5 KADMIJ (Cd)****1. 5. 1 Oblike in nahajanje**

Industrija cinka je največji vir kadmija, drugi viri pa so fosfatna goriva in pesticidi. Kadmij se sprošča v okolje tudi z izločanjem odpadnih industrijskih snovi in z izgorevanjem fosilnih goriv ter s sežiganjem plastike in pigmentov na osnovi kadmija. Lahko ga najdemo tudi v hrani, vodi in cigaretne dimu. Kadmij obstaja le v enem oksidacijskem stanju,  $2+$ , in ne tvori stabilnih organskih spojin.

**1. 5. 2 Mehanizem toksičnosti**

Kadmij inhibira encime, ki vsebujejo SH skupine, veže pa se tudi s karboksilno, cisteinsko, hidroksilno in fosfatno skupino proteinov in purinov. (5)

### **1. 5. 3 Vnos v telo in izločanje**

Slabo se absorbira iz prebavil. Absorpcija je povečana pri pomanjkanju kalcija in železa in pri nizkoproteinskih dietah. Pomanjkanje kalcija stimulira sintezo kalcij vezavnih proteinov, ki povečajo absorpcijo kadmija. Na splošno imajo ženske večjo koncentracijo kadmija v krvi kot moški. Pri ženskah je zaradi nizke količine skladiščenega železa povečana absorpcija kadmija iz prebavil. Preko dihal se absorbira 10 do 40 odstotkov vdihanega kadmija. (4) Večina absorbiranega kadmija se izloča v urin. Izloča se tudi preko prebavne cevi, in sicer v žolč kot kompleks z glutationom. Kadmij se transportira po krvi vezan na eritrocite in visokomolekularne plazemske proteine, predvsem albumin. Primarno se shranjuje v jetrih in ledvicah.

### **1. 5. 4 Klinična slika**

Akutna zastrupitev je rezultat vnosa relativno visoke koncentracije kadmijevih soli oralno ali kadmijevega prahu ter dima (navadno kadmijev oksid) preko dihal. Zgodnji znaki zastrupitve so posledica lokalne iritacije, in v primeru zaužitja so to slabost, bruhanje, slinjenje, diareja in abdominalni krči. Če smo izpostavljeni kratek čas, je kadmij bolj toksičen, če je vnesen preko dihal. Znaki in simptomi, ki se pojavijo v nekaj urah, vključujejo draženje respiratornega trakta s hudim pnevmonitisom, bolečinami v prsih, slabostjo, vrtoglavico in diarejo. (12,13) Dolgotrajni učinki pri izpostavitvi majhnim količinam kadmija se kažejo v kronični obstruktivni pljučni bolezni, emfizemu in kronični bolezni renalnih tubulov. Poškodovan je tudi kardiovaskularni sistem in skelet.

Ledvice so prizadeta ne glede na to, ali je bil vnos kadmija preko pljuč ali prebavne cevi, medtem ko so poškodbe pljuč vidne le pri izpostavitvi preko dihal.

- *Pljuča*: Kronična pljučna bolezen je rezultat kroničnega bronhitisa, fibroze spodnjih dihal in poškodbe alveolov, ki vodijo do emfizema. (6)

- *Ledvica*: Kadmij se v jetrih poveže v kompleks z glutationom in se izloči v žolč. Pri koncentraciji kadmija v ledvični skorji 200 µg/g se pojavijo poškodbe proksimalnih tubulov in proteinurija. (4) V urin prehajajo nizko molekularni proteini. Pri koncentraciji kadmija v ledvični skorji 200 µg/g se pojavijo poškodbe proksimalnih tubulov in proteinurija. (4) V urin prehajajo nizko molekularni proteini. (4)

- *Kardiovaskularni sistem*: Kadmij ima pomembno vlogo pri nastanku hipertenzije.



- *Kosti*: Kadmij vpliva na presnovo kalcija, fosfatov in kosti. (6) Pri kronični izpostavljenosti kadmiju lahko v urinu zaznamo nižjo koncentracijo kalcija od normalne - hipokalcemija. Spremembe skeleta lahko povežemo s pomanjkanjem kalcija, in se kažejo kot bolečine v kosteh, osteomalaciji in /ali osteoporozi.

### ***1. 5. 5 Teratogenost in kancerogenost***

Kancerogenost kadmija je dokazana z epidemiološkimi študijami pri osebah, ki so poklicno izpostavljeni kadmiju. Identificirali so tumor pljuč in prostate ter v manjšem obsegu tumor ledvic in želodca. (4) IARC (ang. International Agency for Research on Cancer; Mednarodna agencija za raziskavo rakavih obolenj) je kadmij 1994 uvrstila kot kancerogen kategorije 1 - snov, ki dokazano povzroča raka pri človeku; osnovano na povezavi s tumorjem pljuč. (8)

### ***1. 5. 6 Biološki indikatorji***

Za ugotavljanje nepravilnega delovanja renalnih tubulov, pri stiku s kadmijem, se uporablja koncentracija  $\beta_2$ -mikroglobulina, NAG in metalotioneina, v povezavi s koncentracijo kadmija v urinu. (6) Na okvaro tubulov, ki jo povzroči stik s kadmijem, je občutljiv tudi encim NAG. Noben indikator za določanje okvare tubulov ni specifičen pokazatelj učinkov kadmija in njihove koncentracije morajo biti interpretirane v povezavi z ustreznim povišanjem kadmija v seču. (6) Merjenje koncentracije kadmija v seču je dober indikator za ugotavljanje prekomerne izpostavljenosti kovini. Večina kadmija je v urinu vezanega na metalotionein. Za merjenje metalotionenina se uporabljajo radioimunološke metode. (4, 14, 15)

### ***1. 5. 7 Laboratorijska diagnostika***

Koncentracijo kadmija ugotavljamo z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo.  $\beta$ -mikroglobulin v urinu analiziramo z imunonefelometrijo ob prisotnosti lateksa, pri kateri so lateksni delci prekriti z ustreznimi protitelesi. Pride do aglutinacije delcev, kar vidimo kot nastanek oborine.

Princip radioimunološke metode, ki se uporablja za določanje metalotioneina, je merjenje imunskih kompleksov med antigenom in ustreznimi protitelesi, kot označevalec kompleksov pa uporabimo radioaktivno substanco. NAG analiziramo spektrofotometrično.

Kadmij analiziramo v polni krvi in v 24-urnem urinu, pri katerem je potrebno določiti volumen zbranega vzorca. Pri zbiranju vzorca se morajo uporabljati injekcije za enkratno uporabo in plastične posodice, ki imajo majhno vsebnost kadmija. Tako zmanjšamo kontaminacijo vzorca s kadmijem iz okolja. (9)

#### referenčne vrednosti

kadmij

polna kri            0.32-2.72 µg/L

urin                    0.12-2.58 µg/L

### **1. 5. 8 Zdravljenje**

Za zdravljenje zastrupitve s kadmijem trenutno ni odobrene terapije s kelati, vendar se priporoča  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ . Skupni odmerek  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  v 5 dneh ne sme presegati 500 mg/kg. (4) Težko je določiti učinkovito zdravljenje intoksikacije. Kelatorji sicer povečajo izločanje Cd, povečajo pa tudi renalno toksičnost, ker kelat v ledvicah hitro disociira. (4,5)

## **1. 6 ARZEN (As)**

### **1. 6. 1 Oblike in nahajanje**

Arzen je lahko trivalenten ali petvalenten in je zelo razširjen v naravi. Arzenove spojine se uporabljajo v industriji barvil, kovinski industriji (nevaren vir arzenovodika, ki se sprošča pri obdelovanju kovin, onečiščenih z arzenom), industriji keramike, steklarstvu, industriji pesticidov, herbicidov in drugih poljedeljskih sredstev. Arzen je prisoten v premogu, in se sprošča v okolje med izgorevanjem. Od arzenovih spojin sta toksikološko pomembna predvsem arzenov hidrid - arzin ( $\text{HbAs}$ ) in arzenik (arzenov (III) oksid  $\text{As}_2\text{O}_3$ ). (4,6,11)

### **1. 6. 2 Mehanizem toksičnosti**

Trivalentne arzenove spojine so glavne toksične oblike, medtem ko imajo petvalentne arzenove spojine majhen učinek na aktivnost encimov. Arzen vpliva na mitohondrialne encime in oslabi sprejemanje kisika v tkiva in izločanje ogljikovega dioksida iz tkiv. Arzen zavira oksidativno fosforilacijo. V mitohondrijih, kar se kaže v povečani aktivnosti mitohondrialne ATP-aze, in preprečuje nastajanje energetske bogatih molekul ATP. (4,5,6,8,)

### **1. 6. 3 Vnos v telo in izločanje**

Arzen pride v telo z zaužitjem elementa, vdihavanjem delcev, ki so v zraku, prehaja pa tudi preko kože. Iz prebavil se absorbira 80-90 odstotkov arzenita ali arzenata. (6)

Arzen se v zraku večinoma nahaja v obliki trivalentnega arzenovega trioksida. Absorpcija iz pljuč je odvisna od velikosti in kemijske oblike delcev. Absorbirani arzen se izloči iz telesa predvsem z urinom. Razpolovna doba vnesenega anorganskega arzena je 10 ur, razpolovna doba metiliranega arzena je približno 30 ur. Arzen se izloča tudi z znojem. Nalaga se v laseh in nohtih, in lahko kaže na stik z arzenom v preteklosti. (6) Značilnost zastrupitve z arzenom je hemoliza, do katere verjetno pride zaradi vezave arzena na hemoglobin in kasnejše reakcije s kisikom. Pojavijo se glavobol, anoreksija, bruhanje, bolečine v trebuhu, hemoglobinurija, bilirubinemija in anurija. (4,6,8) Arzen se kopiči v jetrih, ledvicah, srcu in pljučih. Manjše količine lahko najdemo v mišicah in živčnih tkivih. Zaradi kemijske podobnosti fosforju se nalaga tudi v kosti in zobe ter tu ostaja dlje časa. Zlahka prehaja skozi placento in povzroča poškodbe ploda. Iz telesa se izloča po več poteh: blato, urin, znoj, mleko, lasje, koža, pljuča. Največ se ga izloča v urin. (5,6,8)

### **1. 6. 4 Klinična slika**

Število zastrupitev z arzenom (naključnih in namernih- umor, samomor) se je zelo zmanjšalo. Pogost vzrok zastrupitev je bil arzen v obliki arzenovega trioksida,  $As_2O_3$ , ker je zlahka dosegljiv, je praktično brez okusa in izgleda kot sladkor. Približno v eni uri po vnosu arzena v telo, se pojavijo prebavne motnje. Žareče ustnice, stiskanje v grlu, težko

požiranje so prvi simptomi, ki jim sledijo zelo močne želodčne bolečine, bruhanje in huda diareja. Navadno je prisotna oligurija s proteinurijo in hematurijo. Sčasoma se pojavi anurija. Značilna je huda žeja. V intervalih se kažejo hipoksični krči. Vse vodi v komo in smrt. Pri hudi zastrupitvi lahko smrt nastopi v eni uri, vendar je običajen interval 24 ur. (4,6,8,11)

Zelo pogosti zgodnji znaki kronične zastrupitve z arzenovimi spojinami so mišična oslabelost in bolečina, pigmentacija kože, hiperkeratoza in edem. Drugi znaki in simptomi, ki kažejo na zastrupitev z arzenom, vključujejo vonj zadaha in znoja po česnu, prekomerno slinjenje in znojenje, stomatitis, generalizirano srbenje, boleče grlo, prehlad, solzenje, odrevenelost, zbadanje v ekstremitetah, dermatitis, viti ligo (depigmentirane kožne ploskve) in alopecijo. Povečajo se jetra, obstrukcija žolčnega voda pa se kaže v zlatenici. Sčasoma pride do ciroze jeter. Zelo je poškodovan kostni mozeg. (4,6,8,11)

### ***1. 6. 5 Teratogenost in kancerogenost***

Potencialna kancerogenost arzenovih spojin je bila ugotovljena že pred več kot 100 leti. Hutchinson (1887) je opazoval nenavadno število kožnega raka pri pacientih, ki so se zdravili z arzenovimi spojinami. (6) Sedaj je dokazano, da arzen z absorpcijo preko pljuč povzroča raka na pljučih, zato je EPA (ang. Environmental Protection Agency, Agencija za zaščito okolja, 1988) uvrstila arzen v skupino karcinogenov, ki dokazano povzročajo raka pri človeku. (6)

### ***1. 6. 6 Biološki indikatorji***

Biološki indikatorji, ki kažejo na izpostavljenost arzenu, so koncentracija arzena v urinu, krvi in laseh. Urinska koncentracija je najboljši pokazatelj izpostavljenosti, ker je urin glavna pot izločanja večine arzenovih spojin. (6) Večina absorbiranih anorganskih ali organskih arzenovih spojin ima v krvi majhno razpolovno dobo, zato je koncentracija arzena v krvi povečana le kratek čas po absorpciji. Koncentracijo merimo v polni krvi in ne v serumu, ker se večina arzenovih spojin nahaja v rdečih krvnih celicah. V primerjavi z urinom je kri manj občutljiv indikator izpostavljenosti arzenu. (6,14,15)

### 1. 6. 7 *Laboratorijska diagnostika*

Koncentracija arzena se v kliničnih toksikoloških laboratorijih ugotavlja s plamensko atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo. (9) Ugotavljanje koncentracije arzena v urinu je klinično bolj koristno od ugotavljanja arzena v krvi, posebno, če ni potrebna totalna koncentracija arzena, temveč moramo razlikovati med organskim in anorganskim arzenom. (9)

#### referenčne vrednosti (9)

polna kri	0.4 -12.0 µg/L
urin	2.3-31.0 µg/L

### 1. 6. 8 *Zdravljenje*

Po izpostavitvi arzenu je potrebno bolnika stabilizirati in preprečiti nadaljnjo absorpcijo kovine. Pozornost je usmerjena v intravaskularni volumen, ker učinki arzena na GIT lahko povzročijo usodni šok. Hipotenzija zahteva nadomeščanje tekočin, mogoča pa je tudi uporaba zdravil, ki povečujejo pritisk.

## 1. 7 DOLOČANJE TEŽKIH KOVIN

Toksikološke analize so zahtevne in razmeroma drage. Za določanje težkih kovin se predvsem uporablja atomska absorpcijska spektrofotometrija (AAS). Osnova spektroskopskih metod je interakcija med svetlobo in snovjo v vzorcu, ki daje nek signal, ta pa predstavlja analitsko informacijo.

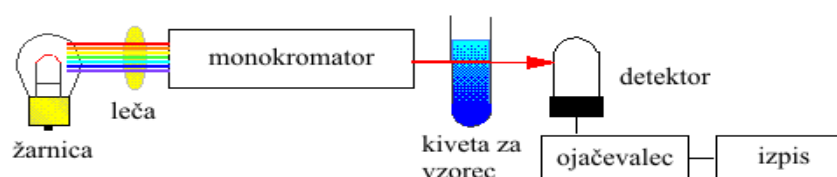
Metode delimo na *atomske* spektroskopske, kjer gre za analizo atoma in *molekulske*, kjer gre za analizo molekule strukture. Delimo pa jih tudi na *absorpcijske* in *emisijske*.

**-Pri absorpcijski spektrofotometriji** vzorec obsevamo s svetlobo. Pri visoki temperaturi preidejo atomi v atomizirano stanje, in v tem stanju absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine, merimo pa intenziteto svetlobe, ki pride iz vzorca.

Inštrument je sestavljen iz vira svetlobe, monokromatorja za selekcijo valovne dolžine, kivete za vzorec ter detektorja.

-**Pri emisijskih metodah vzorec** razpršimo v plamen zmesi plina in zraka, in pri visoki temperaturi plamena atomi prehajajo v vzbujeno stanje in pri vračanju v osnovno stanje oddajajo (emitirajo) svetlobo določene valovne dolžine. Količino emitirane svetlobe merimo, in je sorazmerna s koncentracijo analita v vzorcu.

Sestava aparata je enaka kot pri absorpcijski, le da ni potreben izvor svetlobe, kjer je vir radiacije plamen.



Slika 2: SESTAVA APARATA - Atomska absorpcijska spektrofotometrija

## 1.8 NAG (N-acetil $\beta$ -D-glukozaminidaza)

N-acetilglukozamin ali GlcNAc je monosaharidni derivat glukoze. Je amid med glukozaminom in očetno kislino. Ima molekulsko formulo  $C_8H_{15}NO_6$ , molsko maso 221,21 g/mol, in je pomemben v večini bioloških procesov. Je del biopolimera v bakterijski celični steni, zgrajene iz izmeničnih enot GlcNAc in N-acetilmuranske kisline (MurNAc), navzkrižno povezano z oligopeptidi na ostanek mlečne kisline MurNAc. Ta večplastna struktura se imenuje peptidoglikan.

NAG (EC 3.2.1.30) N-acetilglukozaminidaza je lizosomalni encim, visoke molekulske mase, in ga najdemo v mnogih tkivih telesa. Zaradi svoje visoke molekulske mase se ne more prenesti v glomerulni ultrafiltrat. Vendar pa ta encim kaže visoko aktivnost v proksimalnih ledvičnih tubularnih celicah ter pušča tubulno tekočino kot ultrafiltrat skozi proksimalne tubule. Ko so proksimalne tubulne celice ranjene zaradi poljubnega bolezenskega procesa, vključno z glomerulno proteinurijo, hiperglikemijo, nefritisa, transplantacijske zavrnitve ali nefrotoksičnih dejavnikov (antibiotiki, antiepileptiki...), urin svoje ravni povečuje, in tako se uporablja kot odsev proksimalne tubulne nekroze celic.

### ***1. 8. 1 Struktura in sinteza***

NAG je eksoglikozidaza iz skupine lizosomskih hidrolaz. Eksoglikozidaze katalizirajo cepljenje glikozidne vezi na nereducirajočem mestu sestavljenih ogljikohidratnih molekul, kot so glikoproteini, glikozaminoglikani in glikolipidi (16,17)

Lizosomske hidrolaze se sintetizirajo na ribosomih zrnatega endoplazmatskega retikuluma, in se preko gladkega endoplazmatskega retikuluma prenesejo na Golgijev aparat, kjer se uskladiščijo v primarnih lizosomih. Veliko lizosomov je v celicah proksimalnih tubulov ledvic. Raziskave so pokazale, da je aktivnost NAG največja prav v izolirani frakciji proksimalnih tubulov (18,19). NAG je lizosomalni encim visoke molekulske mase, in ga najdemo v mnogih tkivih telesa.

### ***1. 8. 2 Izoencimi NAG***

Z elektroforezo na škrobnem gelu ali z izoelektričnim fokusiranjem je možno izolirati dva glavna izoencima, NAG-A in NAG-B. Izoencima se razlikujeta v strukturi podenot, saj jih kodirajo različni geni. Poleg tega se razlikujeta tudi v naboju, različna pa je tudi njuna občutljivost na temperaturo. Po 35 minutah inkubacije pri 50°C ima NAG-B 95% aktivnost, NAG-A pa le 25%. Oba izoencima se pojavljata v urinu, kjer ima izoencim B 10-20% aktivnosti (17,19). V tkivih in telesnih tekočinah sta prisotni še intermediarni obliki I<sup>1</sup> in I<sup>2</sup>. V serumu se nahaja še izoencim A<sup>s</sup>, v serumu nosečnic najdemo tudi izoencim P. Izoencimov A<sup>s</sup> in P navadno ni v urinu (20). Izoencim C je dokazan v ekstraktih embrionalnega tkiva, ni ga pa v serumu (17). Ostale izoencime lahko ločujemo z elektroforezo, s kromatografijo na ionskem izmenjevalcu in z izoelektričnim fokusiranjem, ali pa za ločbo uporabimo razliko v občutljivosti na neuraminidazo (19).

Tkivni izoencim A in serumski izoencim A<sup>s</sup> se med seboj razlikujeta v več značilnostih. NAG-A je prisoten v urinu, medtem ko se izoencim A<sup>s</sup> ne filtrira skozi glomerule, in ga tako (normalno) ni v urinu. Prisotnost tega izoencima v urinu dokazuje lahko prepuščanje serumskih beljakovin oziroma poškodbo ledvičnih glomerulov. Pri takih poškodbah je povečana aktivnost celokupne NAG v urinu. Pri nekaterih malignih tumorjih se poveča aktivnost intermediarnih oblik I<sup>1</sup> in I<sup>2</sup>. Nihanje v aktivnosti celokupne NAG je sorazmerno količini poškodovanega tkiva, kar lahko opazujemo tekom bolezni (19).

Tudi pri sladkorni bolezni prihaja do sprememb v aktivnosti NAG, ki se hitro odzove na številne spremembe, v organizmu (zvišana koncentracija glukoze, insulinsko zdravljenje, kronični zapleti, itd.). Zato se merjenje aktivnosti NAG in njenih izoencimov čedalje bolj uporablja pri diabetesu, za kontrolo metabolne urejenosti in za zgodnje odkrivanje zapletov sladkorne bolezni.

### ***1. 8. 3 Pomen dokazovanja NAG***

Merjenje NAG služi za nadzor krvnega sladkorja oziroma koncentracije glukoze v krvi, saj je aktivnost NAG zvišana pri obeh tipih diabetesa (21). Zvišana aktivnost NAG pri diabetikih je povezana s stopnjo hiperglikemije, s trajanjem diabetesa, z metabolno urejenostjo, posredno pa tudi z zapleti, ki lahko nastanejo v času sladkorne bolezni. NAG pa je tudi dober pokazatelj funkcije ledvic - glomerularne in tubularne (22). Poškodbe ledvic lahko povzročijo razna zdravila, začasna stanja hipoksije in ostale patološke oscilacije kisika. Merjenje zvišane aktivnosti NAG v urinu lahko služi za ocenitev stopnje poškodovanosti ledvic. Merjenje NAG je pomembno tudi pri reakciji zavračanja presajenih ledvic, za katero je značilno zvišanje izoencimov I<sup>1</sup> in I<sup>2</sup>(19). Povečano aktivnost NAG lahko zasledimo pri poškodbah, ki so posledica hipertenzije in kirurških posegov, pri ledvičnih spremembah v času nosečnosti (23) ter pri akutnem glomerulonefritisu in nefrotskem sindromu. Raziskave so pokazale, da je povečanje eksekrecije NAG-B dokaz za selektivne poškodbe tubulov, saj je le-ta vezana na membrane lizosomov, in se bo izločila le v primeru, ko je celica poškodovana.

### ***1. 8. 4 Metode za merjenje NAG***

Aktivnost NAG lahko ugotovljamo s hidrolizo odgovarjajočega substrata (24):

1. substrati za spektrofotometrično merjenje aktivnosti:

- 4MeU (4-metilumbeliferil-N-acetil-beta-D-glukozaminid)

2. substrati za spektrofotometrično določevanje aktivnosti:

- p-nitrofenil-N-beta-D-glukozaminid
- P-GlcNAc

(2-metoksi-4-(2-nitrovinil)-fenil-N-acetil-beta-D-glukozaminid)



- MCP-GlcNAc

(m-krezol-sulfonftaleinil-N-acetil-beta-D-glukozaminid)

- VRA-GlcNAc

(amonium5-(4-(2-acetamido-2-deoksi-beta-D-glukopiranosiloksi)-3-metoksifenil metilen)-2-tioksitiazolidin-4-on-3-etanoat).

V urinu so prisotni endogeni aktivatorji in inhibitorji NAG z nizko molekulsko maso. Zato se merjenje NAG v urinu izvaja šele po dializi, gelski filtraciji ali redčenju urina. Z uporabo MCP-GlcNAc pa predhodna separacija urina ni potrebna. To je substrat visoke topnosti, ki omogoča nasičenje encima pri nizkih koncentracijah, obenem pa zagotavlja najnižjo stopnjo interferenc (25). Spektrofotometrične metode s fenolnim N-acetilglukozaminidom delimo v dve skupini. V prvo skupino spada metoda ene točke, pri kateri se s pomočjo alkalnega pufru prekine encimska reakcija. Pri tem spremljamo spremembo barve, ki nastane zaradi odcepitev kromatogene fenolne molekule. K drugi skupini metod pa prištevamo kontinuirane metode, kjer se uporabljajo substrati z vgrajenim fenolnim aglikanom z nizko pKa vrednostjo. Pri pH med 4,8 in 6,25 se fenolni aglikan odcepi, pri tem pa se razvije barva. V tem primeru ni potrebno dodajati pufru za prekinjanje reakcije. Za kontinuirano merjenje potrebujemo kisli medij, ki ga dosežemo z vgradnjo močnega elektron-akceptorskega substituenta na aromatskem jedru fenola (24).

### ***1. 8. 5 Vzorec za določitev NAG***

Obstajata dva načina zbiranja urina za določitev NAG. Določimo lahko katalitično aktivnost v 24-urnem urinu ali pa v naključnem vzorcu urina.

- **24-urni urin** se zbira tako, da se prvi jutranji urin zavrže, ker je bil ta v organizmu že od prejšnjega dne, vsako naslednje izločanje urina pa se zbira v posebno posodo z oznako volumna. Urin se zbira preko celega dneva in noči vključno s prvim jutranjim urinom. Posodo z urinom med zbiranjem hranimo v temnem in hladnem prostoru. Tako zbranemu 24-urnemu urinu izmerimo volumen, zabeležimo možne organoleptične posebnosti, in določimo kreatinin po eni izmed modifikacij Jaffejeve metode.

- ***Naključni urin*** je urin izločen v naključnem času preko dneva. Tudi temu urinu določimo koncentracijo kreatinina. Encimsko aktivnost izračunamo na mmol kreatinina, in se s tem izognemo potrebi po zbiranju 24-urnega urina, saj upoštevamo spremembe v diurezi. Kreatinin nastaja iz kreatin-fosfata, in se konstantno izloča z urinom.

Obstojnost encima beta-NAG ostane nespremenjena teden dni pri +4°C. Če urin takoj, ko ga dobimo v analizo, zamrznemo na -20°C, je encim obstojen mesec dni, pri -70°C pa je encim obstojen eno leto (26).

Aktivnost NAG lahko izrazimo v enotah:

- $\mu\text{kat/L}$  - količina urina ni podana,
- $\mu\text{kat/mmol}$  - imamo podatek za kreatinin v milimolih,
- $\mu\text{kat/dan}$  - imamo volumen 24-urnega urina.

## 2 NAMEN DELA

N-acetilglukozaminidaza je lizosomalni encim, visoke molekulske mase, in ga najdemo v mnogih tkivih telesa. Zaradi svoje visoke molekulske mase se ne more prenesti v glomerulni ultrafiltrat. Vendar pa ta encim kaže visoko aktivnost v proksimalnih ledvičnih tubularnih celicah. Ko so proksimalne tubulne celice poškodovane zaradi določene bolezni, se koncentracija NAG poveča.

V diplomski nalogi smo analizirali vzorce otrok iz različnih slovenskih okolij in rezultate statistično ovrednotili z namenom, da ugotovimo:

- Ali se koncentracije NAG v urinu razlikujejo glede na kraj bivanja?
- Ali imajo prebivalci območij, ki so bolj obremenjeni s težkimi kovinami, že kakšne okvare ledvic, kar bomo ugotovili v primeru povišane koncentracije NAG?

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Vzorci

Analizirali smo 181 vzorcev plazme in urina otrok, starih od 7 do 12 let, ki smo jih razdelili v tri skupine, glede na to v kakšnem življenjskem okolju živijo. Otroke iz osnovne šole Žužemberk smo uvrstili v skupino otrok živečih v kmečkem okolju; otroke iz Idrije smo uvrstili v skupino iz obremenjenega okolja, otroke iz osnovne šole Vižmarje-Brod pa v skupino otrok v mestnem okolju.

### 3.2 Opis spektrofotometrične metode

Encim N-acetil-beta-D-glukozaminidaza hidrolizira substrat 3-krezol-sulfonftalein-N-acetil-beta-D-glukozaminid do 3-krezol-sulfoftalein, katerega absorbanco merimo spektrofotometrično.

Spektrofotometrične metode temeljijo na merjenju absorbcije vidne in ultravijolične svetlobe pri določenih valovnih dolžinah, ki so karakteristične za posamezne kemijske zvrsti. Pri prehodu monokromatične svetlobe, določene valovne dolžine skozi raztopino, se jakost vpadnega žarka zmanjša zaradi absorbcije svetlobe (27).

Po Beer-Lambertovem zakonu izrazimo absorbanco ali ekstinkcijo z enačbami:

$$A = \epsilon \cdot I \cdot c$$

A - absorbanca ali ekstinkcija

$\epsilon$  - molarna absorbtivnost (1/mol.cm)

I - pot žarka (cm)

c - koncentracija snovi (mol/l)

$$A = -\log T = \log J_0 / J$$

T - transmitanca (%)

$J_0$  - jakost vpadnega žarka

J - jakost prepuščenega žarka

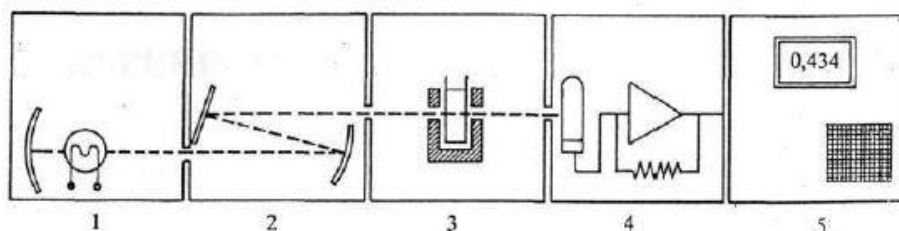
V večkomponentnem sistemu se absorbance (A) posameznih zvrsti seštevajo, pogoj pa je, da zvrsti med seboj ne reagirajo. Za merjenje absorbcije svetlobe uporabljamo spektralne ali filtrne fotometre.

Bistveni sestavni deli vsakega spektralnega fotometra :

- primarni izvor svetlobe,
- monokromator (prizma ali mrežica),
- detektor prepuščene svetlobe.

Pri filternih fotometrih so namesto monokromatorja barvni ali interferenčni filtri.

S spektrofotometri lahko merimo ultravijolično območje (100-400 nm) in vidno področje (400-700 nm).

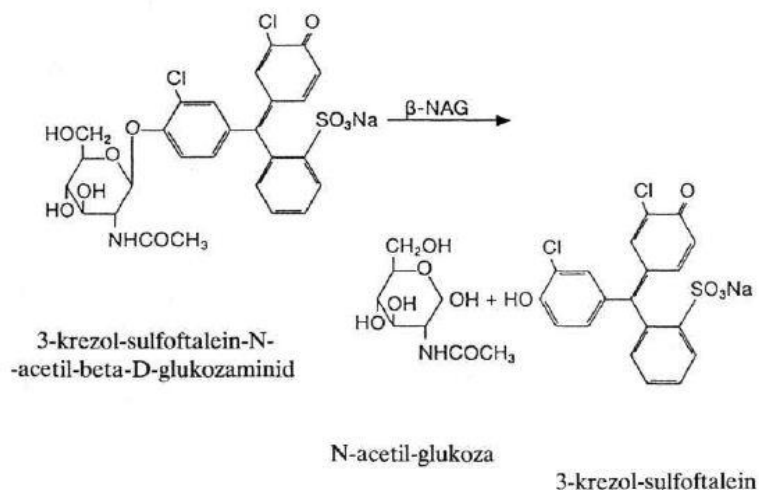


- |                    |                                                 |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| 1 - izvor svetlobe | 4 - detektor, ojačanje signala                  |
| 2 - monokromator   | 5 - pretvorba signala, prikaz rezultata meritve |
| 3 - kiveta         |                                                 |

Slika 3: skica spektrofotometra

### 3. 3 Princip metode in reakcija

3-krezol-sulfoftalein-N-acetil-beta-D-glukozaminid se pod vplivom encima beta-NAG spremeni v 3-krezol-sulfoftalein in N-acetil-glukoza. Nastali 3-krezolsulfoftalein merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 580 nm (16).



Slika 4: shema reakcije

### 3. 4 Material, aparature in reagenti

Material in aparature:

Pipete, epruvete, termostat 37°C, merilni valji, ura štoparica, aparat Beckman 700.

Reagenti:

N-acetyl-beta-D-glukozaminidaza (beta-NAG) za kolorimetrično določanje encima v urinu. (Boehringer-Mannheim, kataloška št. 875-406)

Komplet reagentov vsebuje:

- 1.-Kalijev citrat
- 2.-Liofiliziran substrat, sol 3-krezol-sulfoftalein-N-acetil-beta-glukozaminid in boraks
- 3.-Natrijev karbonat

Priprava reagentov:

Puferna raztopina - reagent št. 1 raztopimo v 55 ml redestilirane vode.

Substrat - reagent št. 2 raztopimo v 55 ml puferne raztopine.

Stop reagent - reagent št. 3 raztopimo v 110 ml redestilirane vode.

Obstojnost reagentov:

Substrat je obstojen mesec dni pri +4°C, če je zaščiten pred svetlobo. Stop reagent je stabilen mesec dni pri +4°C.

### 3. 5 Postopek in pogoji merjenja

Pogoji merjenja na spektrofotometru:

-Temperatura 37°C

-Valovna dolžina 580 nm

-Pot žarka 1 cm

-Merilni volumen 1,550 ml

-Ekstinkcijski koeficient za 3-krezol-sulfoftalelin-N-acetil-beta-glukozaminid pri  $\lambda$  580 nm 40,67 L/mmol . cm

-Čas 1800 s

REAGENT	VZOREC	SLEPI REAGENT
Substrat	0,500	0,500
Inkubiramo 5 minut na 37°C in dodamo:		
Vzorec	0,050	-
Voda	-	0,050
Pomešamo in inkubiramo točno 30 minut na 37°C in dodamo:		
Stop reagent	1,000	1,000
Pomešamo in izmerimo absorbanco po 10 minutah		

Slika 5: postopek merjenja

### 3. 6 Izračun, interpretacija rezultata in orientacijske vrednosti

$$\text{Katalitična aktivnost encima (nkat/L)} = \frac{\Delta c \cdot V_2}{\Delta t \cdot V_1} = \frac{\Delta A \cdot V_2 \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d \cdot V_1 \cdot \Delta t}$$

$$\Delta c = \frac{\log J_0 / J}{\varepsilon \cdot d} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d} = \text{koncentracija (mol/L)}$$

t..... čas (s)

V2..... skupni volumen (ml)

V1..... volumen vzorca (ml)

d..... pot žarka (cm)

$\varepsilon$ ..... ekstinkcijski koeficient za 3-krezol-sulfoftalein-N-acetilglukozaminid pri  $\lambda$  580 nm (L/mmol . cm)

$\Delta A$  = absorbanca vzorca - absorbanca slepega vzorca

beta-NAG (μkat/L)

kreatinin (mmol/L)

beta NAG/kreatinin (μkat/mmol)

Rezultate podajamo v obliki razmerja beta-NAG / kreatinin, ker je to razmerje diagnostično pomembno.

Orientacijske referentne vrednosti: 1,45-9,19 μkat/mmol kreatinina (28)



## **4 EKSPERIMENTALNI DEL**

### **4. 1 Zbiranje podatkov**

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

### **4. 2 Obdelava podatkov**

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

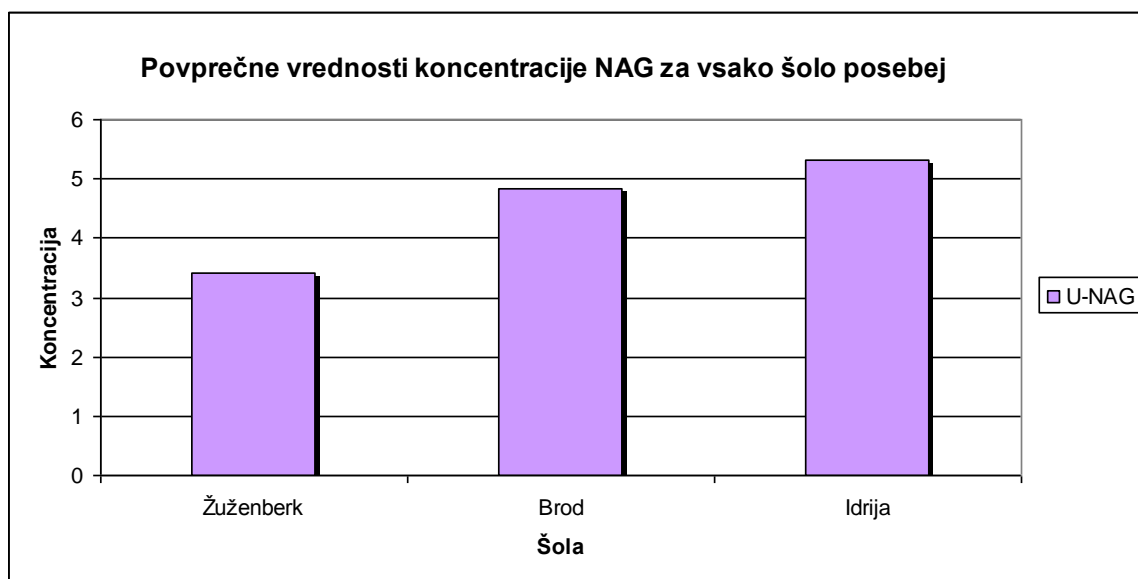
### **4. 3 Skupinska analiza**

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

### **4. 4 Analiza skupinskih rezultatov**

Za primerjanje povprečnih vrednosti med seboj oz. ali se meritve statistično razlikujejo, smo uporabili t-test. Vse statistične teste smo opravili pri stopnji značilnosti 0,05.

## 5 REZULTATI



Graf 1: povprečne vrednosti NAG za vsako šolo posebej

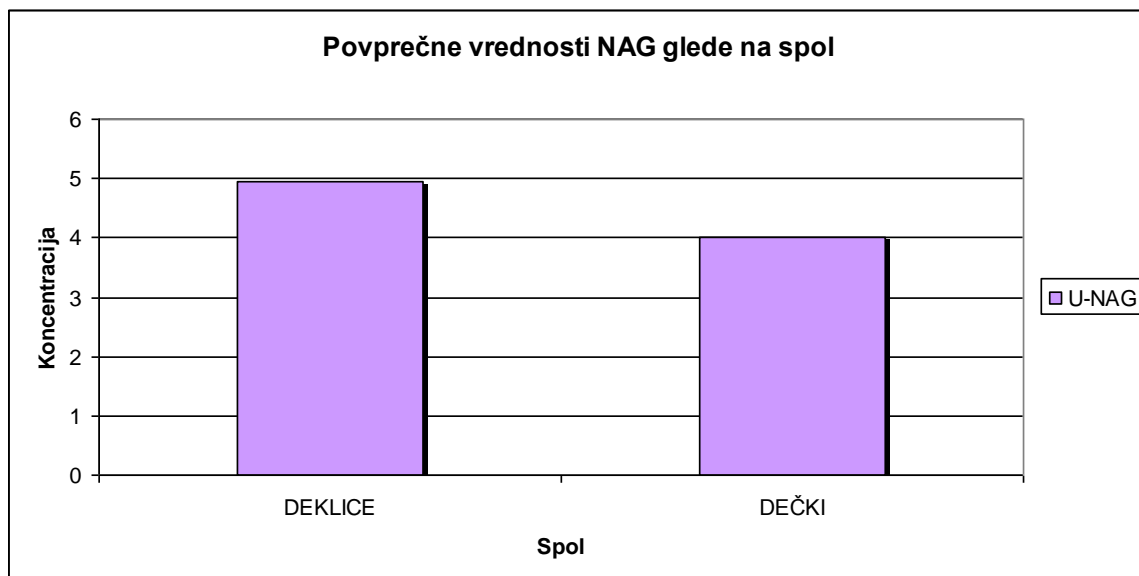
	NAG	st.odklon	N
<b>Žuženberk</b>	3.41	2.43	69
<b>Brod</b>	4.82	2.53	45
<b>Idrija</b>	5.31	3.61	67
<b>Skupaj</b>	4.46	3.05	181

Tabela 1: povprečne vrednosti NAG za vsako šolo posebej

Povprečne vrednosti v posameznih šolah se razlikujejo. Največje razlike so med Žuženberkom in Idrijo, kjer je razlika v povprečnih vrednostih za skoraj 2  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . Najmanjše vrednosti so imeli v povprečju v Žuženberku (3.41  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ), največje pa v Idriji (5.31  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ). V Brodu, kjer je bila povprečna vrednost 4.82  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$  je povprečna vrednost najbolj blizu povprečju celotnega vzorca (4.46  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ )

V splošnem so se pokazale velike razlike med osebami, ki jim je bil merjen NAG, saj znaša standardni odklon na vzorcu kar 3.05. Največje razlike znotraj šol so se pojavile v Idriji. Otroci v tej šoli so imeli najbolj razpršene vrednosti NAG, standardni odklon tu znaša kar 3.61. Najmanjšo razpršenost vrednosti NAG pa so imeli v Žuženberku.

Preiskave vzorcev, ki smo jih naredili pri otrocih so pokazale, da povprečna vrednost izmerjenega NAG na vsako šolo ne presega mejne vrednosti NAG, ki je od 1,45 do 9,19  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ .



Graf 2: povprečne vrednosti NAG glede na spol

	NAG ( $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ )	st.odklon	N
<b>DEKLICE</b>	4.95	3.59	89
<b>DEČKI</b>	4	2.35	91
<b>SKUPAJ</b>	4.46	3.05	181

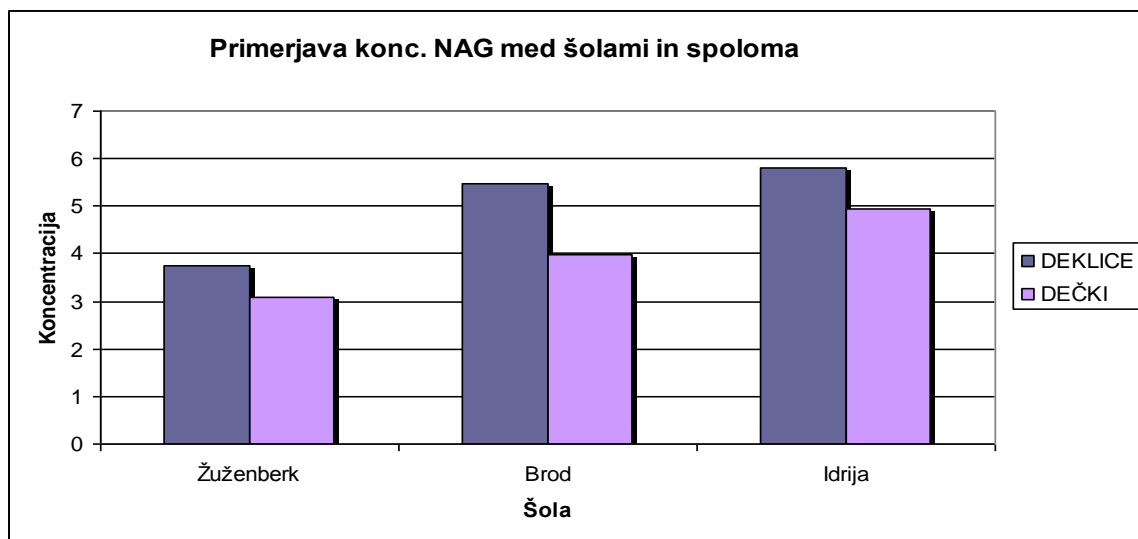
Tabela 2: povprečne vrednosti NAG glede na spol

Dečki so imeli v povprečju za skoraj eno enoto nižjo vrednost NAG od deklic, pri katerih je NAG znašal skoraj 5  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . Manjše razlike v vrednosti U-Naga so se pokazale med dečki (standardni odklon znaša slabi 2 enoti). Pri deklicah je razpršenost večja (razlika je za dobro enoto).

SPOL	n	x	s2	se	$\pm 1.96 * se\%$	$d=x1-x1$	$se(p1-p2)$	t-test
prvi vzorec	89	4,95	1	0,11	0,21	0,95	0,15	6,37
drugi vzorec	91	4	1	0,10	0,21	-	-	-

Tabela 3: primerjava med spoloma (t-test)

T-test med skupino dečkov in deklic pokaže statistične razlike, saj je vrednost statistike  $t$  6.37, kar pomeni, da se signifikanca zelo približuje vrednosti 0. Pri tako majhni signifikanci torej že lahko govorimo o statistično značilnih razlikah med obema podvzorcema.



Graf 3: primerjava konc. NAG med šolami in spoloma

	povprečje		st.odklon		N	
	DEKLICE	DEČKI	DEKLICE	DEČKI	DEKLICE	DEČKI
<b>Žuženberk</b>	3,76	3,08	2,97	1,79	33	36
<b>Brod</b>	5,48	3,99	2,93	1,63	25	20
<b>Idrija</b>	5,79	4,95	4,35	2,48	32	35

Tabela 4: primerjava konc. NAG med šolami in spoloma

Iz grafa lahko razberemo, da so višje koncentracije pri deklicah (iz vseh treh šol). Najvišjo povprečno koncentracijo imajo deklice iz Idrije, in sicer 5,79  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ , sledijo deklice iz Broda, ki imajo povprečno koncentracijo 5,48  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$  in nato deklice iz Žuženberka, pri katerih je povprečna koncentracija 3,76  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . Prav tako smo tudi pri dečkih iz Idrije izračunali povprečno koncentracijo, ki je 4,95  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ , in je v primerjavi s koncentracijo dečkov iz drugih šol, najvišja. Dečkom iz Idrije sledijo dečki iz

Broda s povprečno koncentracijo 3,99  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$  ter iz Žužemberka s povprečno koncentracijo 3,76  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ .

V povprečju imajo deklice dosti višje koncentracije kot dečki, povprečne vrednosti pa ne presegajo mejne vrednosti.

<b>ŽB</b>	n	x	s2	se	$\pm 1.96^*se\%$	$d=x1-x1$	$se(p1-p2)$	t-test
<b>prvi vzorec</b>	<b>69</b>	<b>3,41</b>	<b>1</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>	<b>-1,41</b>	<b>0,19</b>	<b>-7,36</b>
<b>drugi vzorec</b>	<b>45</b>	<b>4,82</b>	<b>1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,29</b>		-	-
<b>ŽI</b>	n	x	s2	se	$\pm 1.96^*se\%$	$d=x1-x1$	$se(p1-p2)$	t-test
<b>prvi vzorec</b>	<b>69</b>	<b>3,41</b>	<b>1</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>	<b>-1,9</b>	<b>0,17</b>	<b>-11,08</b>
<b>drugi vzorec</b>	<b>67</b>	<b>5,31</b>	<b>1</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>		-	-
<b>BI</b>	n	x	s2	se	$\pm 1.96^*se\%$	$d=x1-x1$	$se(p1-p2)$	t-test
<b>prvi vzorec</b>	<b>45</b>	<b>4,82</b>	<b>1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,29</b>	<b>-0,49</b>	<b>0,19</b>	<b>-2,54</b>
<b>drugi vzorec</b>	<b>67</b>	<b>5,31</b>	<b>1</b>	<b>0,12</b>	<b>0,24</b>		-	-

Tabela 5: primerjava med šolami (t-test)

Testi povezanosti kažejo, da so razlike med podvzorci (šolami) statistično značilne. Razlike med Žužemberkom in Brodom ( $t = -7$ ) ter Idrijo in Žužemberkom ( $t = -11$ ) so statistično značilne. Tudi razlike med Idrijo in Brodom so statistično značilne, le da je v tem primeru signifikanca že nekoliko višja (pribl. 5%).

	<b>DEKLICE</b>	<b>DEČKI</b>
<b>Žužemberk</b>	2	0
<b>Brod</b>	2	0
<b>Idrija</b>	4	3

Tabela 6: število otrok s preseženimi koncentracijami

Najvišja izmerjena koncentracija je iz Idrije, in sicer 19,25  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$  (glej tabelo v prilogi). Tu je bilo 7 učencev, ki so imeli povišano koncentracijo, od tega 4 deklice ter 3 dečki. V Žužemberku in Brodu pa sta povišano koncentracijo imeli le po dve deklici.

## 6 RAZPRAVA

N-acetilglukozaminidaza je lizosomalni encim, visoke molekulske mase, in ga najdemo v mnogih tkivih telesa. Merjenje NAG služi za nadzor krvnega sladkorja oz. koncentracijo glukoze v krvi. Poleg tega je tudi dober pokazatelj funkcije ledvic. Ledvice so eden izmed glavnih tarčnih organov za težke kovine in različne organske spojine, ki se v ledvicah lahko akumulirajo, in s tem povzročajo poškodbe predvsem v tubulnem delu ledvic, lahko pa tudi na glomerulih. Prisotnost tega izoencima v urinu dokazuje lahko prepuščanje serumskih beljakovin oziroma poškodbo ledvičnih glomerulov. Pri takih poškodbah je povečana aktivnost skupne NAG v urinu. Merjenje zvišane koncentracije NAG v urinu lahko služi za ocenitev stopnje poškodovanosti ledvic. Referentne vrednosti za NAG so od 1,45 do 9,19  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ .

V naši raziskavi je bilo vključenih 181 otrok, starih od 7 do 12 let. Povprečne vrednosti koncentracije NAG v posameznih šolah se razlikujejo.

Najprej smo med seboj primerjali povprečne vrednosti koncentracije NAG med učenci iz vseh treh šol. Povprečne koncentracije v posamezni šoli se razlikujejo. Največje razlike so med učenci Žužemberka in Idrije, saj je razlika v povprečni vrednosti skoraj za 2 enoti. Najmanjše povprečne vrednosti so imeli v Žužemberku (3,41  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ), največje pa v Idriji (5,31  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ). V Brodu, kjer je bila povprečna vrednost 4,82  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ , je najbolj blizu povprečju koncentracije NAG celotnega vzorca (4,46  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ).

V splošnem so se pokazale velike razlike med osebami, ki jim je bila izmerjena koncentracija NAG, saj znaša standardni odklon na vzorcu kar 3,05.

Največje razlike znotraj šol so se pojavile v Idriji. Otroci na tej šoli so imeli najbolj razpršene vrednosti; standardni odklon tu znaša kar 3,61. Najmanjšo razpršenost pa so imeli otroci iz Žužemberka.

Izmerili smo tudi nekaj vzorcev, ki so imeli povišano koncentracijo NAG. V Idriji je 7 učencev, ki imajo povišane koncentracije, v osnovnih šolah Žužemberk in Brod pa po 2 učenca. Najvišja izmerjena koncentracija je bila pri deklici iz Idrije (19,25  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ). Najvišje vrednosti v Idriji je bilo tudi za pričakovati, saj je to območje v primerjavi z ostalimi mesti najbolj onesnaženo s težkimi kovinami (Hg).

Meritve vzorcev, ki smo jih naredili pri otrocih, so pokazale, da povprečne vrednosti izmerjenega NAG na vsako šolo ne presegajo mejne vrednosti, ki je od 1,45 do 9,19  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ .

Primerjali smo tudi povprečne vrednosti NAG glede na spol. Dečki so imeli povprečno koncentracijo 4  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ , deklice pa 4,95  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ . Dečki imajo za eno enoto nižjo povprečno koncentracijo NAG. Pri deklicah je tudi razpršenost večja.

Tukaj smo naredili tudi t-test, ki je pokazal statistične razlike med obema podvzorcema.

Na koncu smo še primerjali koncentracije NAG med šolami in med spoloma in ugotovili, da so na vseh treh šolah višje koncentracije pri deklicah. Najvišjo povprečno koncentracijo imajo deklice iz Idrije (5,79  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ), sledijo deklice iz Broda (5,48  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ) in nato iz Žužemberka (3,76  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ).

Dečki iz Idrije imajo povprečno koncentracijo 4,95  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ , in je v primerjavi z dečki iz drugih šol najvišja. Sledijo fantje iz Broda (3,99  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ) in nato še iz Žužemberka (3,76  $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ ).

V povprečju imajo deklice dosti višje koncentracije kot fantje, povprečne vrednosti pa ne presegajo mejne vrednosti.

Naredili smo še teste povezanosti, ki kažejo, da so rezultati med podvzorcji statistično značilni.

V primerjavo smo vzeli tudi rezultate iz drugih diplom, pri katerih so bili analizirani isti otroci iz enakih območij. Najnižja povprečna koncentracija kadmija pri otrocih je v Idriji, najvišja pa v Žužemberku. Tudi koncentracija svinca je najnižja v Idriji, v Žužemberku pa najvišja. Prav tako je tudi koncentracija cinka najvišja v Žužemberku, najnižja pa v Vižmarje-Brod. Povišane koncentracije so posledice agrokemikalij in ogromne uporabe škropiv. Živo srebro je značilno za Idrijo; tam so tudi najvišje koncentracije, najnižje pa v Žužemberku. Selen je največ v Brodu, najmanj pa v Idriji.

## 7 SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali se koncentracije NAG razlikujejo glede na to, kje živimo in ali imajo prebivalci območij, ki so bolj obremenjeni s težkimi kovinami, prisotne že kakšne okvare ledvic.

Na podlagi rezultatov lahko zaključim naslednje:

- Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da otroci, ki smo jih zajeli v preiskavo, povprečno nimajo povišanih koncentracij NAG in to, ne glede na to, ali živijo v mestnem, kmečkem ali obremenjenem okolju.
- Na podlagi rezultatov t-testa, ki smo ga opravili, lahko trdimo, da se koncentracije NAG statistično razlikujejo glede na to, iz kakšnega življenjskega okolja prihajajo otroci.
- Najvišje koncentracije NAG so prisotne pri otrocih iz osnovne šole Idrija, ki predstavljajo obremenjeno okolje s težkimi kovinami, najnižje pa otroci osnovne šole Žužemberk, ki predstavljajo kmečko okolje.
- Ugotovili smo tudi statistične razlike v koncentraciji NAG glede na spol. Deklice imajo v povprečju dosti višje koncentracije kot dečki.
- Izmerili smo tudi nekaj povišanih koncentracij; največ v Idriji. To območje velja za onesnaženo, predvsem z živim srebrom. Tako sklepamo, da gre pri osebah, katere so imele povišano koncentracijo NAG, za okvaro ledvic.
- Vse otroke, pri katerih smo določili povišane vrednosti NAG, smo napotili k osebemu zdravniku, da jih je pregledal, in ugotovil razlog povišanih koncentracij.

V našem okolju, bodisi kmečkem, mestnem ali obremenjenem, je ogromno škodljivih dejavnikov, ki lahko vplivajo na naše zdravje. Da bi se v prihodnje izognili oz. zmanjšali vnos teh snovi, lahko zmanjšamo določene razvade, ki



pospešujejo vnos toksičnih snovi v telo, in poskrbimo za bolj čisto okolje...(razne čistilne akcije, čistilne naprave, vožnja s kolesom, naravna gnojila...).

## 8 LITERATURA

1. Krajnc I, Pečovnik Balon B: *Interna medicina*, Univerza v Mariboru, Visoka zdravstvena šola, Maribor, 2000: 179-206.
2. Plut Š: *Anatomija in fiziologija človeka*, učbenik, DZS, Ljubljana, 2002: 167-173.
3. Barovič V: *Patologija, patološka fiziologija in osnove interne medicine*, 1.izd., 1. natis, DZS, Ljubljana, 1999: 193-214.
4. Wonsiewicz MJ, McCurdi P: Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., USA, 1995: 1649-1669.
5. Gossel AT, Bricker JD: *Principles of clinical toxicology*, 3rd ed., Raven Press, New York, 1994:1-39, 179-215.
6. Klaassen CD: *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, 6th ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., USA, 2001: 812-847.
7. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/admeh.html>. (dostopano Maj 2010)
8. Hayes WA: *Principles and methods of toxicology*, 4th ed., Taylor & Francis, Philadelphia, 2001: 650-670.
9. Lothar T: *Clinical laboratory diagnostics*, 1st ed., TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt/Main, 1998.
10. <http://ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lead/lead.htm>. (dostopano Maj 2010)
11. Krejči F, Jamšek M, Gričar M, Pance I: *Osnove klinične toksikologije*, 3.izd., Klinični center, Ljubljana, 1994.
12. Braunwald E: *Harrison's principles of internal medicine*, 15th ed., McGraw-Hill, New York, 2001: 2590-2595.
13. Jokanović M: *Toksikologija*, Elit Medica, Beograd, 2001.
14. Dreisbach RH, Robertson WO, *Trovanja: preventiva, dijagnostika i lečenje*, 2.izdaja, Savremena administracija, Beograd, 1989.
15. Dreisbach RH, *Trovanja: diagnoza i lečenje*, Savremena administracija, Beograd, 1980.
16. Barret J.A: Properties of lysosomal enzymes: *Lysosomes in biology and pathology* 2; Dingle J.T, Fell H.B. (Eds.), North-Holland/American Elsevier, 1975: 245-312.

17. Coma P, Gomez-Chacon L, Garcia-Serrano B, Fernandez E, Ortiz-Apodaca M.A: *Alfa-glucosidase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes in serum*, Clinical chemistry 38/2, 1992: 223-226.
18. Hultberg B, Ockerman P.A, Norden A.E: *Isoenzymes of four acid hydrolases in human kidney and urine*, Clinical Chemistry, Acta 52, 1974: 239-243.
19. Ellis B.G, Tucker S.M, Thompson A.E, Price R.g: *Presence of serum and tissue forms of NAGA in urine from patients with renal disease*, Clinical Chemistry, Acta 64, 1975: 195-202.
20. Hočevar D: Magistrski rad: *Biokemijski efekti u tkivima, krvnom serumu i urinu diabetičnih štakora nakon transplantacije Langerhansovih otočića*, Zagreb, 1990.
21. Hiratsuka N, Shiba K, Nishida K, Iizima S, Kimura M, Kobayashi S: *Analysis of urinary albumin, transferrin, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and beta2-microglobulin in patients with impaired glucose tolerance*, School of Allied Health Sciences, Faculty of medicine, Tokyo Medical and Dental University, Japan. J Clin. Lab. Anal., 1998: 351-355.
22. Brouhard B.H, La Grone L, Travis L.B, Pollard T.G: *Response of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase to rapid decreases in blood glucose*, Clin. Chem. Acta., 1984: 197-202.
23. Csathy L, Pocsi I, Kiss L, Balla G, Modi N, Price R.G: *The effect of polycythemia and hypoxia in urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in newborns*, Clinical Chemistry, Acta 195, 1990:77-84.
24. Pocsi I, Taylor S.A, Richardson A.C, Aamlid K.H, Smith B.V, Price R.G: *»VRA-GlcNAc«: Novel substrate for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase applied to assay of this enzyme in urine*, Clinical Chemistry 36/11, 1990: 1884-1888.
25. Konings C.H, Mulder C: *Effect of gel filtration on urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity measured by the m-cresolsulfonphthaleinyl procedure*, Clinical Chemistry 36/2, 1990: 402-403.
26. Manley S.E., Burton M.E., Fisher K.E., Culi C.A., Turner R.C.: *Decrease in albumin / creatinine and N-acetylglucosaminidase / creatinine ratios in urine samples stored at -20°C*, Clinical Chemistry, Nov. 1992: 2294-2299.
27. Jesenovec N, Jurman-Gros T, Gros M: *Klinična kemija in biokemija 1*, DZS, Ljubljana, 1992: 56-74.

28. Jesenovec N: *Orientacijske referentne vrednosti za odrasle za potrebe laboratorijskih formularjev v klinično biokemičnih laboratorijih SR Slovenije*, Novis 3, 1987: 31-35.
29. [http:// www.farma-drustvo.si/gradivo\\_p/Toksikoloska%20kemija/SEMINARJI/biomarkerji.doc](http://www.farma-drustvo.si/gradivo_p/Toksikoloska%20kemija/SEMINARJI/biomarkerji.doc).  
(dostopano Maj 2010)
30. <http://www.slodiver.net/medicina/izlocala.asp>. (dostopano Maj 2010)
31. [http://www.vivalis.si/index.php?option=com\\_content&task=view&id=87&Itemid=62](http://www.vivalis.si/index.php?option=com_content&task=view&id=87&Itemid=62). (dostopano Maj 2010)
32. <http://www.biomonitoring.si/kemikalije-kot-onesnazevala/>. (dostopano Maj 2010)
33. [http:// www.farma-drustvo.si/gradivo\\_l/Toksikologija/2-Predavanja.doc](http://www.farma-drustvo.si/gradivo_l/Toksikologija/2-Predavanja.doc).  
(dostopano Maj 2010)
34. [http://www.urboil.bf.uni-lj.si/nivo/3\\_o\\_tleh/tla\\_tk.htm](http://www.urboil.bf.uni-lj.si/nivo/3_o_tleh/tla_tk.htm). (dostopano Maj 2010)
35. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kovina>. (dostopano Maj 2010)
36. <http://www.kemija.org/index.php/okolje-mainmenu-40/25-okoljecat/225-onesnaevanje-tal>. (dostopano Maj 2010)
37. <http://en.wikipedia.org/wiki/N-Acetylglucosamine>. (dostopano Maj 2010)
38. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html>. (dostopano Maj 2010)

## 9. PRILOGA

Podatki uporabljeni v diplomski nalogi:

Zaporedna številka vzorca	OŠ ŽUŽEMBERK Konc.Nag ( $\mu$ kat/mmol)	OŠ IDRIJA Konc.Nag ( $\mu$ kat/mmol)	OŠ VIŽMARJE- BROD Konc.Nag ( $\mu$ kat/mmol)
1	1,47	11,49	2,09
2	5,15	4,25	5,58
3	2,79	2,71	7,76
4	1,64	4,56	6,15
5	3,20	8,75	2,42
6	2,50	2,48	5,92
7	2,65	14,00	15,71
8	2,08	3,02	4,18
9	0,74	5,35	4,18
10	2,62	3,33	7,74
11	1,03	8,64	3,81
12	3,81	5,42	3,90
13	5,00	6,20	5,14
14	1,18	2,48	6,91
15	3,86	3,84	3,90
16	3,17	1,17	4,19
17	2,61	3,45	4,45
18	7,91	8,73	4,55
19	4,05	5,27	3,46
20	2,99	2,04	2,52
21	1,18	6,88	5,58
22	5,20	5,48	5,64
23	2,08	1,41	2,13
24	1,22	3,14	3,71
25	1,20	19,25	5,09
26	4,21	5,82	2,62
27	4,25	0,98	7,62
28	3,86	4,03	3,02
29	2,20	6,36	4,79
30	1,18	6,40	1,04
31	5,16	4,95	4,51
32	3,67	4,21	3,80
33	2,12	1,07	3,48
34	1,43	5,13	7,22
35	3,81	3,88	2,88

36	3,68	2,34	6,40
37	8,54	6,04	3,22
38	4,78	8,51	6,36
39	2,19	4,96	0,96
40	3,79	2,67	5,59
41	15,24	5,00	2,22
42	1,29	4,05	5,83
43	1,43	8,51	4,40
44	1,55	3,23	10,18
45	4,16	17,27	4,00
46	3,44	2,69	
47	5,33	7,17	
48	1,39	0,95	
49	1,47	1,28	
50	4,73	7,13	
51	2,58	5,07	
52	6,40	6,95	
53	8,07	7,08	
54	2,98	3,66	
55	4,29	9,70	
56	5,08	9,70	
57	3,16	9,70	
58	4,32	3,72	
59	1,94	5,42	
60	0,74	0,98	
61	1,20	6,26	
62	1,59	2,29	
63	2,94	8,26	
64	10,19	1,51	
65	0,98	2,12	
66	2,35	4,00	
67	2,16	1,59	
68	5,52		
69	2,42		
70			