

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA GLADEK

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJA GLADEK

**DOLOČANJE 8-HIDROKSIDEGVANOZINA V URINU PRI OTROCIH
GLEDE NA TO, ALI ŽIVIJO V MESTNEM, KMEČKEM ALI
Z ŽIVIM SREBROM OBREMENJENEM OKOLJU**

**DETERMINATION OF 8-HIDROXYDEOXYGUANOSINE URINE
CONCENTRATION IN CHILDREN, WETHER LIVING IN URBAN, RURAL OR
IN MERCURY LADEN ENVIRONMENT**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. far., spec. med. biokem., višjega svetnika.

Meritve koncentracij 8-hidroksideoksigvanozina in kreatinina v urinu preiskovancev so opravili v Laboratoriju za analitiko urina in spremljanje koncentracije zdravil na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. far., spec. med. biokem., višjemu svetniku, za mentorstvo in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se svojim domačim, ki so me finančno in moralno podpirali tekom celotnega študija.

Zahvaljujem se tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri študiju in pri nastajanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja mag. far., spec. med. biokem., višjega svetnika.

Jerneja Gladek

Predsednica komisije za zagovor: prof. dr. Marija Sollner-Dolenc, mag. far

Član komisije za zagovor: asist. Nejc Horvat, mag. far.

Kazalo vsebine

| | |
|--|------------|
| KAZALO SLIK | III |
| KAZALO PREGLEDNIC | III |
| KAZALO GRAFOV | IV |
| POVZETEK..... | VI |
| SEZNAM KRATIC | VII |
| 1 UVOD | 9 |
| 1.1 DNK – DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISLINA | 9 |
| 1.1.1 Podvajanje oziroma replikacija DNK | 2 |
| 1.1.2 Prepisovanje oziroma transkripcija..... | 4 |
| 1.1.3 Prevajanje oziroma translacija..... | 5 |
| 1.2 MUTACIJE..... | 6 |
| 1.3 OKSIDATIVNI STRES | 7 |
| 1.3.1 Oksidativni stres v mestnem okolju..... | 8 |
| 1.3.2 Živo srebro in oksidativni stres | 8 |
| 1.3.3 Pesticidi na podeželju, povezani z oksidativnim stresom..... | 9 |
| 1.4 8-HIDROKSI-2-DEOKSIGVANOZIN 8-OH-dG | 10 |
| 1.4.1 Določanje koncentracije 8-OH-dG | 11 |
| 2 NAMEN DELA..... | 13 |
| 3 MATERIAL IN METODA DELA | 14 |
| 3.1 BIOLOŠKI VZORCI..... | 14 |
| 3.2 MATERIAL..... | 14 |
| 3.3 REAGENTI..... | 15 |
| 3.4 PRINCIP ENCIMSKO IMUNSKEGA TESTA (ELISA)..... | 15 |
| 3.5 PRINCIP MERJENJA ABSORBANCE..... | 16 |
| 3.5.1 Pomembnejši deli spektrofotometra..... | 18 |
| 3.6 DOLOČEVANJE KREATININA..... | 19 |
| 3.6.1 Analizator Roche/Hitachi 917 | 19 |
| 3.7 STATISTIČNE METODE..... | 20 |
| 4 REZULTATI | 21 |
| 4.1 REZULTATI PO SKUPINAH | 21 |
| 4.1.1 Osnovna šola Žužemberk | 22 |
| 4.1.2 Osnovna šola Idrija | 25 |
| 4.1.3 Osnovna šola Vižmarje Brod | 28 |
| 4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMI | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.1 Primerjava rezultatov osnovnih šol med seboj | 31 |
| 4.2.2 Primerjava rezultatov deklet med osnovnimi šolami | 33 |
| 4.2.3 Primerjava rezultatov dečkov med osnovnimi šolami | 35 |
| 5 RAZPRAVA | 37 |
| 6 SKLEP | 39 |
| 7 LITERATURA: | 40 |
| 8 PRILOGE | 43 |

Kazalo slik

| | |
|---|----|
| Slika 1: DNK ovita večkrat okrog histona | 9 |
| Slika 2: Semikonzervativno podvajanje DNK | 1 |
| Slika 3: Prepisovanje DNK (6)..... | 5 |
| Slika 4: Sinteza proteina (6) | 6 |
| Slika 5: Oksidacija 2-deoksigvanozina (16)..... | 10 |
| Slika 6: Prikaz metode ELISA z manj vrstami protiteles..... | 16 |
| Slika 7: Absorpcijski spekter z valovno dolžino | 17 |

Kazalo preglednic

| | |
|--|----|
| Preglednica I: Kolmogorov-Smirovtest za OŠ Žužemberk..... | 23 |
| Preglednica II: Kolmogorov-Smirnov test za dekleta OŠ Žužemberk | 24 |
| Preglednica III: Kolmogorov-Smirnov test za dečke OŠ Žužemberk..... | 24 |
| Preglednica IV: t-test za dečke in deklice OŠ Žužemberk | 25 |
| Preglednica V: Kolmogorov-Smirnov test za OŠ Idrija..... | 26 |
| Preglednica VI: Kolmogorov-Smirov test za deklice OŠ Idrija..... | 27 |
| Preglednica VII: Kolmogorov-Smirnov test za dečke OŠ Idrija..... | 27 |
| Preglednica VIII: t-test za deklice in dečke OŠ Idrija..... | 28 |
| Preglednica IX: Kolmogorov-Smirnov test za OŠ Vižmarje Brod | 29 |
| Preglednica X: Kolmogorov-Smirnov test za dekleta OŠ Vižmarje Brod | 30 |
| Preglednica XI: kolmogorov - Smirnov test za dečke OŠ Vižmarje Brod..... | 30 |
| Preglednica XII: t-test za deklice in dečke OŠ Vižmarje Brod | 31 |
| Preglednica XIII: Levenejev test homogenosti varianc..... | 32 |
| Preglednica XIV: Test ANOVA za vse tri osnovne šole | 32 |
| Preglednica XV: Games-Howellov test za vse tri osnovne šole | 33 |
| Preglednica XVI: Levenejev test homogenosti varianc za dekleta | 33 |
| Preglednica XVII: Test ANOVA za dekleta | 34 |

| | |
|--|----|
| Preglednica XVIII: Bonferroni test za dekleta | 35 |
| Preglednica XIX: Levenejev test homogenosti varianc za dečke | 35 |
| Preglednica XX: Test ANOVA za dečke | 36 |
| Preglednica XXI: Games-Howellov test za dečke | 36 |
| Preglednica XXII: Dobljene koncentracije 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) v urinu otrok | 43 |
| Preglednica XXIII: Logaritmirane vrednosti 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) (Vrednosti so bile uporabljene v diplomski nalogi.) | 45 |
| Preglednica XXIV: Kolmogorov-Smirnov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu otrok OŠ Žužemberk | 47 |
| Preglednica XXV: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu dečkov OŠ Žužemberk | 47 |
| Preglednica XXVI: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu deklic OŠ Žužemberk | 47 |
| Preglednica XXVII: Kolmogorov-Smirnov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu otrok OŠ Idrija | 48 |
| Preglednica XXVIII: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu dečkov OŠ Idrija | 48 |
| Preglednica XXIX: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu deklic OŠ Idrija | 48 |
| Preglednica XXX: Kolmogorov-Smirnov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu otrok OŠ Vižmarje Brod | 49 |
| Preglednica XXXI: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu dečkov OŠ Vižmarje Brod | 49 |
| Preglednica XXXII: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu deklic OŠ Vižmarje Brod | 49 |

Kazalo grafov

| | |
|---|----|
| Graf 1: Število preiskovancev glede na kraj prebivanja | 21 |
| Graf 2: Povprečna koncentracija 8-OH-dG glede na kraj osnovne šole | 22 |
| Graf 3: Prikaz števila preiskovancev glede na njihovo logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG v urinu | 23 |
| Graf 4: Levo: Prikaz števila preiskovank z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu; desno: Prikaz števila preiskovancev z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu | 24 |
| Graf 5: Prikaz števila preiskovancev glede na njihovo logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG v urinu | 26 |
| Graf 6: Levo: Prikaz števila preiskovank z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu; desno: Prikaz števila preiskovancev z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu | 27 |

| | |
|--|----|
| Graf 7: Prikaz števila preiskovancev glede na njihovo logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG v urinu. | 29 |
| Graf 8: Levo: Prikaz števila preiskovank z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu; desno: Prikaz števila preiskovancev z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu..... | 30 |

POVZETEK

Ljudje smo izpostavljeni različnim vrstam stresa, med drugim tudi oksidativnemu stresu. ta neugodno vpliva na deoksiribonukleinsko kislino DNK. Poškodbe DNK največkrat privedejo do neželenih sprememb pri človeku. Taka bolezen je tudi tumor. Oksidativni stres ne nastane hipno, pač pa smo mu izpostavljeni skozi celo življenje. Na njegov nastanek vplivajo: sam proces staranja, različna vnetja, kraj bivanja, načini življenja ter drugi dejavniki.

V tej diplomski nalogi smo se odločili, da bomo primerjali koncentracijo 8-hidroksideoksiganozina (8-OH-dG) pri otrocih, starih 7 – 11 let, glede na kraj bivanja. 8-hidroksideoksiganozin je splošni in najpogosteje uporabljeni pokazatelj oksidativne poškodbe DNK. Primerjali bomo učence Osnovne šole Žužemberk, ki predstavljajo otroke iz kmečkega okolja, učence Osnovne šole Idrija predstavljajo otroke, živeče v okolju, ki je obremenjeno z živim srebrom in učence Osnovne šole Vižmarje Brod, ki predstavljajo otroke iz urbanega okolja. Dejavniki, ki jih bomo obravnavali kot povzročitelje koncentracije 8-hidroksideoksiganozina, so pesticidi, živo srebro ter izpušni plini.

Preiskava je bila narejena na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Ljubljana leta 2007. Pridobljene rezultate smo statistično obdelali s programom SPSS 17.0. Povprečna koncentracija 8-OH-dG otrok Osnovne šole Žužemberk je 4,3 µg/mmol kreatinina (najvišja koncentracija). Najnižjo povprečno koncentracijo imajo učenci Osnovne šole Idrija, in sicer 2,5 µg/mmol kreatinina. Nekaj višjo koncentracijo imajo otroci Osnovne šole Vižmarje Brod s povprečno koncentracijo 3,0 µg/mmol kreatinina.

Ugotovili smo da se statistično značilno razlikujejo deklice Osnovne šole Žužemberk in Osnovne šole Idrija. Dečki Osnovne šole Žužemberk se statistično razlikujejo od sovrstnikov Osnovne šole Idrija in Osnovne šole Vižmarje Brod. Prav tako nismo uspeli dokazati, da pesticidi, živo srebro ali izpušni plini bistveno vplivajo na višjo koncentracijo 8-OH-dG pri spolu iz enakega okolja.

Seznam kratic

| | |
|-------|---|
| A | adenin |
| ATP | adenin trifosfat |
| C | citozin |
| CTP | citozin trifosfat |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay (angl.), encimsko imunski test |
| G | gvanin |
| HPLC | high performanc liquid chromatography (angl.), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| MS | mass spectrometer (angl.), masni spektrometer |
| NTP | nukleozid trifosfat |
| dNTP | deoksinukleozid tri fosfat |
| ORI | origin of replication (angl.), začetek podvojevanja |
| OŠ | osnovna šola |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen (angl.), proliferirajoči celični jedrni antigen |
| RPA | replication protein A (angl.), podvojevalni protein A |
| Rfc | replication factor C (angl.), podvojevalni faktor C |
| ROS | reactive oxygen species (angl.), reaktivne kisikove spojine |
| RNK | ribonukleinska kislina |

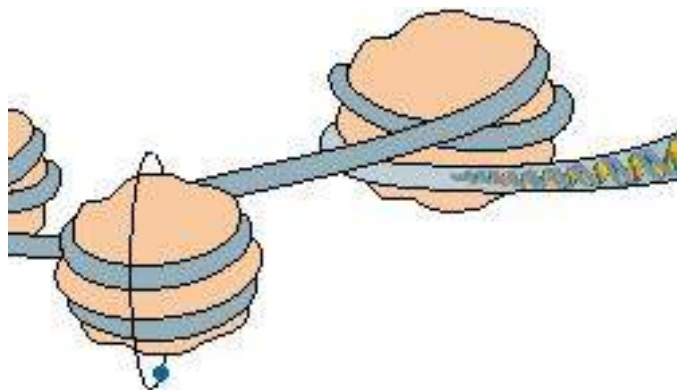
| | |
|---------|---|
| mRNK | informacijska ribonukleinska kislina |
| rRNK | ribosomalna ribonukleinska kislina |
| tRNK | prenašalna ribonukleinska kislina |
| T | timin |
| U | uracil |
| UV- VIS | ultraviolet – visible (angl.), ultravijolična – vidna |

1 UVOD

Prevladujoče celice v človeškem telesu so celice z jedrom, nimajo ga samo celice rdeče krvne vrste (eritrociti). V jedru celice se nahaja genomska deoksiribonukleinska kislina (DNK). Začetek odkrivanja DNK sega že v antiko, v čase, ko je živel Aristotel. A so njegova razmišljanja in teze za nekaj stoletij zamrla. Vse od 18. stoletja naprej se zanimanje za genomsko DNK močno povečuje. Čeprav so jo osamili iz biološkega materiala leta 1868, je bilo prelomno leto 1953, ko sta Watson in Crick odkrila njeno tridimenzionalno strukturo v obliki dvojne vijačnice (1).

1.1 DNK – DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISLINA

Genomska DNK, ki se nahaja v jedru, je spravljena v funkcijskih enotah kromosomih. Če kromosom pogledamo od bližje, vidimo, da je sestavljen iz dveh kromatid. Kromatido pa sestavlja kromosomska nit oziroma kromatin. Kromosomska nit je iz tesno navitih nukleosomov, ki nastanejo, če se DNK večkrat ovije okrog več histonov (Slika1) (2).



Slika 1: DNK, večkrat ovita okrog histona

DNK, ki je nosilka vseh pomembnih informacij za preživetje nekega organizma, je kot smo že omenili, dvojna vijačnica, za katero je značilno:

- Ovitje polinukleotidnih verig (dveh) okrog skupne osi v desno; posledica

tega sta veliki in mali žleb, ki potekata izmenično vzdolž urejene vijačnice.

- Verigi tečeta antiparalelno, kar pomeni, da potekata v nasprotno smer; vendar njune fosfodiestrskeske vezi vedno tečejo v smeri 3',5'.
- V vodnem mediju je kovalentno ogrodje nabito z izmenjujočimi skupinami deoksiriboz in fosfatov na zunanji strani, tako da lahko vstopijo v interakcijo z vodo (H₂O); Purinske in pirimidinske baze se zaradi svoje hidrofobnosti nahajajo v notranjosti strukture.
- Dvojna vijačnica se stabilizira z dvema vrstama interakcij:
 - z vodikovimi vezmi, ki nastanejo med baznimi nasprotnih verig (baze so si komplementarne). Baze, ki se med seboj povezujejo v pare, so adenin (A) – timin (T) in citozin (C) – gvanin (G).
 - z Van der Waalsovimi ter hidrofobnimi vezmi, ki te potekajo ravno tako med bazami.

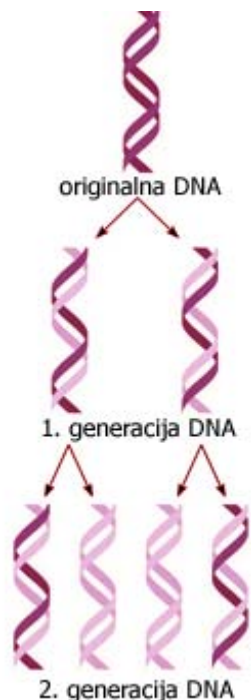
Kemijska zgradba ene verige DNK je relativno enostavna, če pomislimo, koliko in kakšne informacije so shranjene v njej. Sestavljena je namreč iz treh delov dušikovih baz (adenina, citozina, gvanina, timidina), ogljikovih hidratov (sladkorja deoksiriboze) in fosfatov. Dušikova baza in sladkor sta povezana z N-glikozidno vezjo, medtem ko sta sladkor in fosfat povezana s fosfoestersko vezjo.

Komplementarno se vežeta med seboj pirimidinska (timin, citozin) in purinska (adenin, gvanin) baza. Verjetno zato, ker je ta kombinacija strukturno najboljša – če bi se dva pirimidina povezala, bi bila razdalja med njima prevelika, da bi delovale privlačne sile, oziroma bi bila DNK na tem mestu stisnjena. Če bi se povezala dva purina, bi bile molekule preblizu in bi delovale odbojne sile oziroma bi bila molekula DNK na tem mestu širša. Posledice takega vezenja bi bile verjetno takšne, da DNK ne bi bila tako stabilna in se ne bi mogla tako zviti okrog histonov. Posledično bi bilo jedro večje in s tem tudi celice (3).

1.1.1 Podvajanje oziroma replikacija DNK

Podvajanje DNK je lahko konzervativno ali semikonzervativno. Konzervativno podvajanje pomeni, da se matični verigi ločita, podvojita ter se ponovno združita, tako da po

podvajanju ostaneta v dvojni vijačnici matični verigi nedotaknjeni, na novo nastali verigi DNK se združita v novo nastalo dvovijačnico. Za semikonzervativno podvajanje (Slika 2) je značilno takšno podvajanje, da se matični verigi ločita, podvojita in ostaneta združeni z novo nastalo verigo v dvovijačnici (4).



Slika 2: Semikonzervativno podvajanje DNK

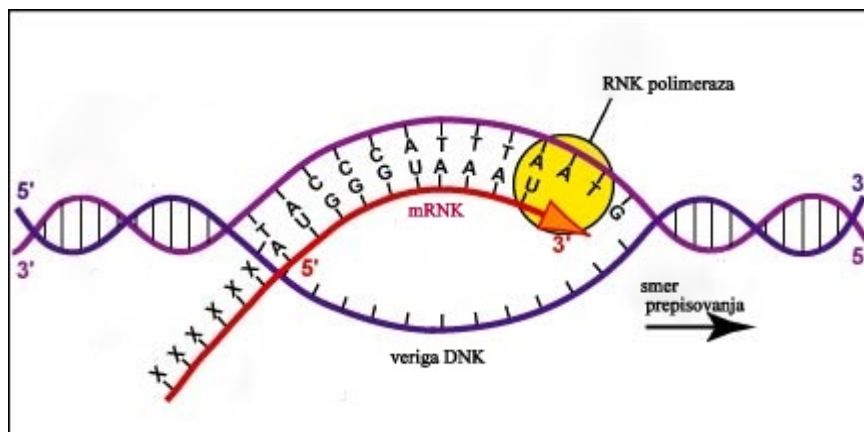
Drugače kot ribonukleinska kislina (RNK) je DNK sintetizirana iz deoksinukleozida-5'-fosfata (dNTP), ki je prekurzor. DNK se sintetizira v smeri $5' \rightarrow 3'$. DNK-polimeraza ne more sama začeti podvajanja, saj za to potrebuje RNK-začetni oligonukleotid. DNK-polimeraza dodaja deoksinukleotide na prosto hidroksilno skupino na 3' koncu rastoče verige. Da se matrica sploh lahko podvaja, se mora odviti, da se lahko posamezna baza primerno veže (z vodikovimi vezmi) z ustrežno bazo v novo hčerinsko verigo. Samo odvijanje se začne na specifičnem mestu – začetek podvojevanja (ORI), ki ga nadzoruje helikaza. Ko se dvovijačnica razvije, se začne podvajanje s pomočjo primaze. Primaza ustvari RNK-začetni oligonukleotid, s katerim nato DNK-polimeraza začne podvajanje DNK. Predel, kjer se DNK podvojuje, imenujemo podvojevalne vilice. Pri podvojevanju pride do težav, saj sta matrici antiparalelni in DNK-polimeraza lahko dodaja nukleotide le v smeri $5' \rightarrow 3'$. Zaradi teh lastnosti pride do tako imenovane vodilne verige, ki se podvaja

v smeri podvojevalnih vilic, in zaostajajoče verige, ki se podvaja v nasprotni smeri podvojevalnih vilic. Pri zaostajajoči verigi nastajajo krajši odseki. Tak odsek podvojene DNK ima svoj RNK-začetni oligonukleotid, ki ga imenujemo Ozakijev fragment. RNK-začetni oligonukleotid fragmenta se odstrani in nadomesti z DNK-verigo iz sosednjega Ozakijevega fragmenta. Dokončno povezavo teh fragmentov opravi DNK- ligaza.

Pri evkariontih se DNK podvaja nekoliko drugače. Začetni oligonukleotid (primer) tako vodilne kot tudi zaostajajoče verige se sintetizira iz kompleksa primaz, ki jih sintetizirajo kratke RNK-primerje in DNK-polimeraze α , ki podaljšujejo RNK primerje z deoksinukleotidi. Tako nastane mešanica RNK-DNK primer. Ta se nadaljuje v hčerinsko obliko DNK z DNK-polimerazo σ . Polimeraza σ oblikuje kompleks s podvojevalnim faktorjem C (Rfc) in proliferirajočim celičnim jedrnim antigenom (PCNA), ki premika kompleks primaza-polimeraza α vzdolž sinteze primerja. Potem ko je matrična DNK ločena na dve (enojni) matrici pri podvojevalnih vilicah, je veriga obdana z veliko kopij proteina podvojevalnega faktorja A (RPA). Ta komformacijska oblika je optimalna za kopiranje z DNK polimerazo. Protein RPA je ločen od matrice s polimerazo α in σ , ki sintetizirata komplementarno verigo matrici (3,4).

1.1.2 Prepisovanje oziroma transkripcija

Prepisovanje oziroma transkripcija se odvija v jedru in pomeni, da se DNK, ki je sestavljena iz baz A,T,C,G, prepíše v RNK. Ta sestoji iz A,U,C,G (zamenjata se bazi timin in uracil). Začetek prepisovanja ali rasti RNK se začne na specifičnem mestu, ki se imenuje promotor. To območje je bogato z A-T baznimi pari v DNK. Na tem mestu se DNK nekoliko razpre (odvije se 10 baznih parov) (5). RNK-polimeraza II sintetizira pre-mRNK v smeri 5'→ 3' z NTP, ravno tako jo podaljšuje v isti smeri z istimi prekurzorji (Slika 3).



Slika 3: Prepisovanje DNK (6)

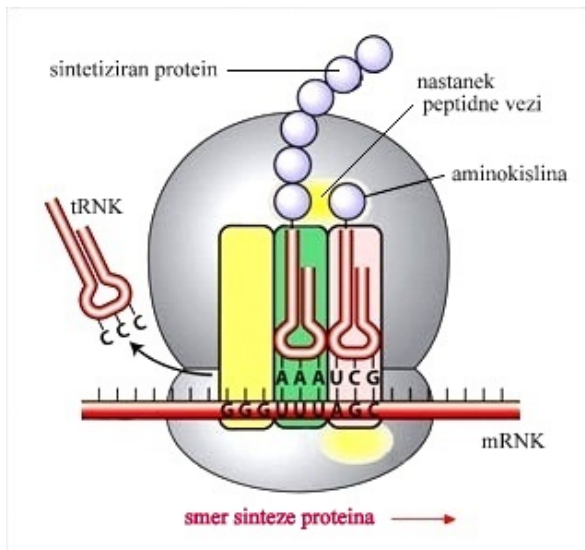
Za uspešen prepis DNK v RNK morajo poteči še določene modifikacije (4,5). To so:

- Izrezovanje intronov (nekodirajoč del DNK).
- Dodajanje poli A-repa, ki ga sintetizira poli A-polimeraza na 3' koncu.
- Sinteza kape, ki jo predstavlja 7-metilgvanozid.
- Na 5' koncu poteka z RNK-polimerazo in drugimi encimi.

1.1.3 Prevajanje oziroma translacija

Za prevajanje, ki poteka v citosolu, so potrebni: informacijska RNK (mRNK), prenašalna RNK (tRNK), ribosomalna RNK (rRNK). rRNK sestavlja ribosom, ki je sestavljen iz manjše podenote, na katero se pritrdi mRNK, in večje podenote, ki je namenjena tRNK. Začetni kodon AUG na mRNK, ki je na manjši podenoti, se poveže z vodikovimi vezmi z antikodonom UAC na tRNK. Večja podenota, ki pride ob nastanku kompleksa mRNK in tRNK, je razdeljena na dva predela – P in A. Antikodon UAC je na predelu P, ko se začne sinteza proteina. Predel A je prost, saj nanj tRNK prinese novo aminokislino, ki je vezana nanjo in jo mRNK kodira. Ko sta oba predela zasedena, se med aminokislinama tvori peptidna vez. Ker se ribosom premika vzdolž mRNK, se tRNK molekuli v ribosomu premakneta tako, da antikodon UAC zapusti ribosom in se s tem tudi loči od nastajajočega proteina. Naslednji antikodon pride na njegovo mesto, mesto P. Predel A je ponovno prost in tRNK prinese novo aminokislino, ki ustreza kodonu. Ta proces se nadaljuje vse do

kodona UAA ali UAG ali UGA, ki je stop kodon. Ko pride na predel A stop kodon, se na nastajajoči protein ne veže več nobena aminokislina in s tem se njegova sinteza ustavi (Slika 4) (7,8).



Slika 4: Sinteza proteina (6)

1.2 MUTACIJE

Mutacije se dogajajo že od začetka življenja na planetu. Niso vedno v škodo organizma, ampak mu lahko olajšajo preživetje oziroma pripomorejo do razvoja novih organizmov. Delimo jih lahko na dve večji skupini, čeprav ju včasih ne moremo popolnoma ločiti. Te dve skupini sta spontane mutacije in mutacije, ki jih sprožijo dejavniki v okolju.

Spontane mutacije razdelimo v podskupine:

- Tranzicija: purin se zamenja z drugim purinom, pirimidin z drugim pirimidinom (npr. A se zamenja z G). Spremeni se aminokislinsko zaporedje in s tem se lahko vpliva na delovanje proteina.
- Transverzija: purin se zamenja s pirimidinom na njegovem mestu ali pirimidin s purinom (npr. A s C). Mutacija spremeni aminokislinsko zaporedje ter s tem vpliva na sintezo in delovanje proteina.

- Mutacije s pomenom: pri tej mutaciji pride v kodonu do spremembe, ki vodi v spremembo aminokislina v proteinu.
- Tiha mutacija: v kodonu se zamenja nukleotid, a se s tem ne spremeni aminokislina v zaporedju proteina (npr. zamenjava na tretjem mestu v kodonu CUC in CUA – oba kodona kodirata levцин).
- Nevtralna mutacija: tu se zamenja bazni par, ki povzroči spremembo v aminokislinskem zaporedju, a ne vpliva na delovanje proteina.
- Nesmiselna mutacija: kodon, ki kodira aminokislino, se zamenja s stop kodonom.
- Mutacija s premikom bralnega okvirja: pojavi se, ko se bazni par ali več baznih parov vrine oziroma izpusti iz osnovnega bralnega okvirja in se tem spremeni aminokislinsko zaporedje v proteinu.

Mutacije, ki jih povzročajo okoljski dejavniki:

- UV-svetloba, ki lahko povzroči dimere.
- Kemikalije, ki so mutagene:
 - lahko so podobe oziroma "imitirajo" baze; imenujemo jih alogene baze;
 - spreminjajo vezivne sposobnosti pri povezovanju baznih parov;
 - alkilirajoči dejavniki lahko povzročijo vse vrste spontanij mutacij.

Pri prepisovanju ali po njem lahko ravno tako pride do poškodb DNK, ki so depurinacija, deaminacija, oksidacija (9,10).

Vse spremembe na DNK, ki se ne popravijo takoj, se prenesejo na naslednje generacije DNK.

1.3 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je izraz, ki ga uporabljamo, ko želimo predstaviti stanje, ki je posledica poškodb celic zaradi reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (11). Značilni povzročitelji oksidativnega stresa so superoksidni radikal ($\bullet O_2$), peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal ($\bullet OH$). Če se ti nahajajo v večji koncentraciji, je večja možnost za povzročitev poškodbe same celice oziroma njenih komponent, saj se poruši homeostatsko ravnotežje. Ravno tako

lahko ROS poškoduje DNK. Reaktivne kisikove spojine nastanejo ob izpostavitvi ioniziranemu sevanju, drogam in drugim kemikalijam, vključno s kovinami – to so eksogeni dejavniki; povzročitelji ROS-a pa so tudi endogeni dejavniki, kot so apoptoza, presnova kisika, vnetni odziv.

Oksidativni stres lahko pri DNK povzroči poškodbe ene vijačnice, kar je za organizem boljše, lahko pa poškoduje obe vijačnici. Če se poškodujeta obe vijačnici, je velika verjetnost, da se poškodujeta na približno enakih mestih, kar se onemogoči popravilo. Zato se DNK ne more pravilno sintetizirati, ker nima primerne matrice, saj se poškodovani del izreže in se nadomesti z novim ali pa se preostala konca preprost združita in s tem skrajšata DNK.

Posledice oksidativnega stresa so lahko: oksidacija lipidov in proteinov, ki vodijo tudi do apoptoze, oksidacija DNK, ki lahko vodi do mutacij in možnosti nastanka raka ter tudi drugih napak v DNK, poškodb mitohondrijev (12).

1.3.1 Oksidativni stres v mestnem okolju

Kljub temu, da imajo tovarne v mestih čistilne naprave, smo ljudje še vedno izpostavljeni veliki količini izpušnih plinov, predvsem iz prevoznih sredstev. Pri izpušnih plinih smo izpostavljeni tako trdnim delcem kot tudi samim spojinam. Posledice teh dejavnikov so spremenjeno delovanje mitohondrijev, nekaterih encimov, zaradi katerih lahko pride do aktivacije vnetnega odziva. Izpušne pline vdihnemo, kemikalije pa zaužijemo posredno, saj se hrana lahko kontaminira tekom transporta ali ob sami rasti (13).

1.3.2 Živo srebro in oksidativni stres

Živo srebro, s katerim prihajamo v stik vsakodnevno, je prisotno v termometrih, sijalkah in se v naravi nahaja v anorganski ali organski obliki. Izpostavljenost živemu srebru je škodljiva za celice - ker škoduje oksidativni fosforilaciji, prav tako škoduje tudi transportu elektronov. Škoduje na način, da porablja antioksidante, naprimrer glutation, vitamine C in E, s tem pa se povečuje aktivnost H₂O₂. Največkrat porabljen antioksidant s strani živega srebra je glutation, saj ima živo srebro povečano afiniteto do redukcije tiolnih skupin pri spojinah. H₂O₂, ki se ne veže z antioksidanti, povzroča oksidativni stres in peroksidacijo lipidov.

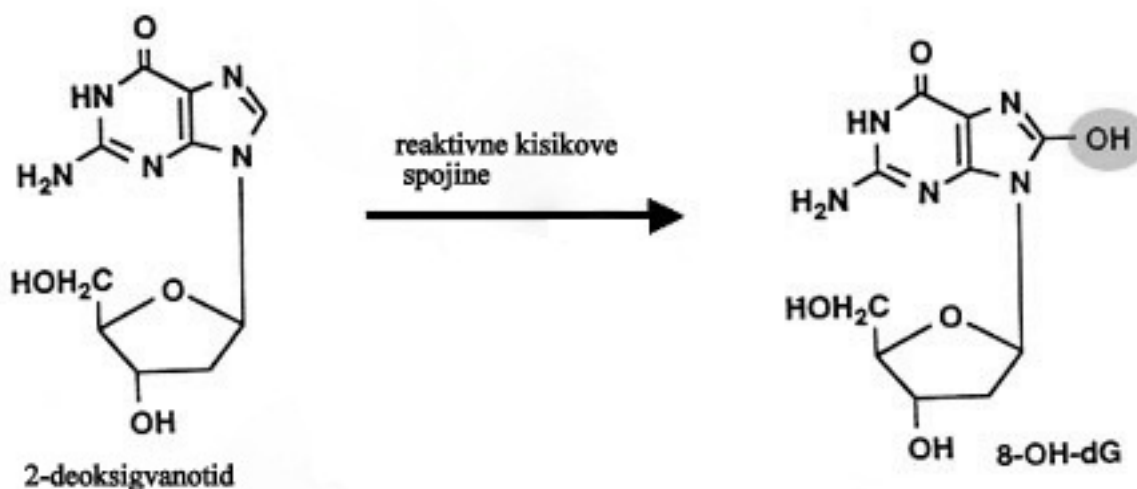
1.3.3 Pesticidi na podeželju, povezani z oksidativnim stresom

Pesticide, ki jih največkrat uporabljamo v kmetijstvu, lahko razdelimo glede na vrsto in način delovanja na organizme ali na kemično sestavo. Sam mehanizem povzročanja oksidativnega stresa ni poznan. Poznano je, da imajo nekateri sposobnost vplivanja na delovanje antioksidantih encimov, nekateri porabljajo antioksidante, nekateri pa v človeškem telesu ob stiku z različnimi snovmi tvorijo reaktivne kisikove zvrsti (14).

1.4 8-HIDROKSI-2-DEOKSIGVANOZIN 8-OH-dG

Molekulo 8-OH-dG sta odkrila Kasai in Nishimura leta 1984. Na začetku so to molekulo določevali s kromatografijo (15).

Oksidacija gvanina oziroma DNK največkrat poteka na C-8 mestu (Slika 5), in je največkrat posledica delovanja hidroksilnega radikala.



Slika 5: Oksidacija 2-deoksigvanozina (16)

Nastala molekula 8-OH-dG je v tautomernem ravnotežju z 8-okso-dG. Molekuli 8-OH-dG in 8-okso-dG sta v nekaterih virih poimenovani pod skupnim imenom 8-okso-dG.

Molekula 8-OH-dG je bila na začetku uporabljena kot biomarker oksidativnega stresa, nato pa so jo odkrili tudi pri drugih boleznih, kot so azbestoza, zastrupitve z arzenom, arterioskleroza, sladkorna bolezen in pri povečani možnosti za nastanek raka. Molekula pa ni le patološko prisotna v človeku, saj smo dnevno izpostavljeni dejavnikom, ki povzročajo reaktivne kisikove spojine. Nepatološko stanje je staranje, saj 8-OH-dG nastaja tudi pod vplivom ultravijoličnih žarkov.

8-OH-dG ne nastaja samo takrat, ko je gvanin že vezan v molekulo DNK kot deoksigvanozin, ampak se v njo lahko vgradi, saj se lahko oksidira že prekurzor dGTP. Oksidirana oblika gvanina posledično izgubi sposobnost baznega parjenja, posledično

privede velikokrat do cepitve baze od sladkorja. Zaradi česar s tem pride do kasnejših mutacij, ki so lahko različne (15,17).

V zadnjih letih so znanstveniki odkrili, da je molekula 8-OH-dG oziroma 8-OH-G škodljiva le v primeru, ko je vezana v DNK oz. RNK. Medtem ko je nevezana oblika tako 8-OH-dG kot 8-OH-G učinkovita pri inaktivaciji Rac v pljučih miši, ki so bile LPS tretirane. Do sedaj je znano, da je Rac udeležen pri vnetnih dejavnostih fagocitov. Naloga fagocitov je odstranitev tujka. Delo fagocitov vsebuje fagocitozo in proizvodnjo reaktivnih kisikovih spojin, kemotakso, proizvodnjo dušikovega oksida. Nekateri izmed njih so povzročitelji oksidativnega stresa. Tako lahko rečemo, da je nevezana oblika v pomoč pri preprečevanju oksidativnega stresa.

Na koncentracijo 8-OH-dG ne vplivajo le reaktivne kisikove spojine, ampak tudi antioksidanti in antioksidantni encimi. Ob njihovi zmanjšani koncentraciji ali zmanjšani aktivnosti se poveša koncentracija ROS-a. Primeri antioksidantnih encimov so superoksidna dismutaza, glutation preroksidaza, katalaze (17).

1.4.1 Določanje koncentracije 8-OH-dG

Koncentracijo 8-OH-dG se največkrat določa na dva načina. Prvi način, ki se uporablja v več laboratorijih, je ELISA in je opisana kasneje. Drugi način je HPLC (18).

Namen HPLC je ločiti preiskovano raztopino na vse komponente, ki jo sestavljajo. Kako dobro se komponente ločijo med seboj, je odvisno od: sestave mobilne faze, sestave stacionarne faze, dolžine kolone, hitrosti potovanja mobilne faze skozi kolono in drugih dejavnikov.

HPLC ločba poteka tako, da črpalka, ki proizvede dovolj velik tlak, usmeri mobilno fazo iz rezervoarja navzdol po koloni. Vzorec, ki se ga injicira v zanko z določenim volumnom, se nahaja med rezervoarjem mobilne faze in kolono. Če je volumen vzorca premajhen, se v to zanko doda mobilno fazo, da se izognemo zračnemu mehurčku, ki bi lahko poslabšal ločbo. Volumen, ki je večji od volumna zanke, odteče v primerno posodo. Tako je vedno zagotovljen enak volumen vzorca. Vzorec nato potuje z mobilno fazo preko stacionarne faze, ki se nahaja v koloni (kolone imajo različno dolžino 3 – 20 mm). Separacijo, ki se odvija na koloni, zazna detektor. Detektorji imajo različne lastnosti, zato se temu primerno

uporabljajo. Poznamo UV-detektor, IR-detektor, fluorescenčni detektor, detektor na reflektivni indeks, elektrokemijski detektor ter MS-detektor.

Kot smo že omenili, sta za dobro separacijo pomembni tako mobilna kot stacionarna faza. Mobilna faza se premika po koloni, napolnjeno s stacionarno fazo. Če je mobilna faza polarna, je stacionarna faza nepolarna. Lastnosti stacionarne faze so tudi oblika, velikost in poroznost njenih delcev. Separacija poteka tako, da imajo molekule v vzorcu različno afiniteto do stacionarne faze. Ravno tako večje molekule prihajajo iz kolone kasneje kot manjše (19).

Za HPLC-ločbo se lahko uporabi kolona YMC-Pack ODS-AM. Pri tej koloni je mobilna faza sestavljena iz vodne raztopine metanola, natrijevega acetata, citronske kisline (20).

2 NAMEN DELA

Dnevno smo ljudje izpostavljeni različnim dejavnikom, ki hote ali nehoti povzročajo oksidativni stres in peroksidacijo lipidov v različnih koncentracijah. V tej diplomski nalogi bomo določevali koncentracijo 8-OH-dG v urinu otrok, starih 7 – 11 let, ki so bili izpostavljeni različnim, za človekovo zdravje škodljivim dejavnikom. Ker otroci, pri katerih smo vzeli urin kot vzorec, prihajajo iz različnega okolja, smo jih razdelili v tri skupine: na otroke, ki prihajajo iz mestnega (Ljubljana Vižmarje Brod), kmečkega (Žužemberk) in z živim srebrom obremenjenega okolja (Idrija).

Otroci, ki prihajajo iz mestnega okolja, so veliko bolj izpostavljeni izpušnim plinom (vsebujejo tako težke kovine kot tudi trdne delce) kot otroci iz drugih dveh skupin. Zato bomo koncentracijo 8-OH-dG pripisali izpostavljenosti izpušnim plinom.

Na podeželju so otroci v večji meri izpostavljeni pesticidom, saj jih kmetje uporabljajo za uničevanje škodljivcev in s tem povečajo pridelavo hrane. Pri otrocih iz te skupine bomo povezali koncentracijo 8-OH-dG z izpostavljenostjo pesticidom.

V tretji skupini so otroci, ki odraščajo v okolju onesnaženem z živim srebrom. Torej bomo tu koncentracijo 8-OH-dG smatrali kot posledico izpostavljenosti živemu srebru.

V tej diplomski nalogi bomo določevali koncentracijo 8-OH-dG in ugotavljali če izpostavljenosti določenim dejavnikom povišuje njegovo koncentracijo. Dobljene rezultate bomo statistično ovrednotili in preverili naslednje hipoteze:

- ◆ Skupine otrok, ki prihajajo iz različnega okolja se razlikujejo glede na to, da so izpostavljene različnim dejavnikom,
- ◆ Spol pri otrocih, ki prihajajo iz istega okolja, ne vpliva na koncentracijo 8-OH-dG.

3 MATERIAL IN METODA DELA

3.1 BIOLOŠKI VZORCI

Pri ljudeh se za diagnozo in različne strokovne preiskave uporabljajo različni vzorci. Vzorec, ki se uporablja, se določi glede nato, kaj želimo izmeriti, predvsem pa kje. Biološki vzorci so kri (pri njej se največkrat uporablja serum, plazma ter polna kri), blato, likvor (tekočina, ki obdaja možgane in hrbtenjačo), tkiva (to so koščki organov), kostni mozeg, znoj, solze, lasje, dlake, nohti, punktati telesnih votlin, prebavni sokovi, razni brisi, semenska tekočina, materino mleko.

Med naj pogosteje uporabljene biološke vzorce spada tudi urin. Povprečno odrasel človek proizvede 1 – 2 litra seča dnevno, ki ima različno intenziteto rumene barve. Ta je odvisna predvsem od koncentracije substanc, ki za telo niso pomembne. Vse snovi, ki jih telo ne potrebuje, se namreč izločijo z urinom ali blatom. Pri urinu poznamo več vrst vzorca: prvi jutranji, drugi jutranji, naključni, 12-urni, dnevni. Za preiskave je najboljši srednji curek (to pomeni, da začetka uriniranja ne lovimo v lonček, da ne bi prišlo do nepotrebne kontaminacije. Ravno tako zavržemo zadnji curek, saj bi se lahko zmanjšala koncentracija substance in s tem bi jo težje določili) prvega jutranjega urina. Pri seču največkrat najprej opravimo test z lističem, na katerem kvalitativno oziroma semikvantitativno izmerimo pH, glukozo, ketone, proteine, hemoglobin, bilirubin, urobilirogen, nitrite, eritrocite, levkocite, nato kvantitativno določimo povišano substanco. Pri mikroskopski preiskavi se uporablja sediment seča. V njem lahko opazimo epitelijske celice, vendar te nimajo diagnostičnega pomena, medtem ko cilindri, bakterije, paraziti, glive, maščobe in kristali kažejo na patološke spremembe (21).

V tej preiskavi je bilo odvzetih 161 vzorcev urina otrok, ki se je do preiskave hranil v hladilniku. Pred samo uporabo se je urin centrifugiral, če ni bil bister.

3.2 MATERIAL

- pipeta in nastavki za pipeto

- mikrotitrne plošče (Innovation Beyond Limits International, Hamburg, Nemčija)
- ura
- bralec mikrotitrne plošče (Personal LabTM, Adalitis srl, Italija)
- hladilnik

3.3 REAGENTI

Vsi reagenti so od istega proizvajalca Innovation Beyond Limits International, Hamburg, Nemčija, so pa naslednji

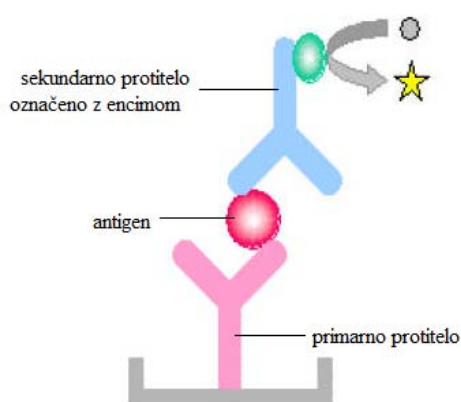
- specifična monoklonska protitelesa za 8-OH-dG fosfatni pufer
- HRP-konjugirana protitelesa
- 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin
- hidrogen peroksidaza v citrat-fosfatnem pufru
- 1M fosforjeva kislina,
- standardna raztopina 8-OH-dG

3.4 PRINCIP ENCIMSKO IMUNSKEGA TESTA (ELISA)

Pri izvedbi metode ELISA so bile na mikrotitrno ploščo že pritrjene molekule 8-OH-dG. Tem že pritrjenim molekulam se doda 50 μ l vzorca oziroma raztopino z znano koncentracijo (standard). Sledi dodajanje 50 μ l primarne raztopine protiteles (fosfatni pufer), ki vsebuje primarna specifična monoklonska protitelesa za 8-OH-dG. Mešanje in inkubacija, je potekala 1 uro pri 37 °C. V tem koraku so pritrjene molekule in molekule v vzorcu (tu je molekula prosta) oz. v standard tekmovali za vezavo s primarnimi protitelesi. Po poteku inkubacije je sledilo spiranje s spiralno tekočino (250 μ l koncentriranega fosfatnega pufru). Namen spiranja je odstranitev primarnih protiteles, ki so se vezala na proste molekule 8-OH-dG ali se sploh niso vezala. Naslednja stopnja pri metodi je dodajanje 100 μ l sekundarnih protiteles (nanje je konjugirano vezan HRP) v sekundarni protitelesni raztopini (raztopina je fosfatni pufer). Ponovnemu stresanju in inkubaciji, ki poteka pri 37 °C 1 uro, sledi spiranje. Spira se z 250 μ l koncentriranega fosfatnega pufru ter doda 100 μ l substrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidine). Temu sledi ponovna 15 minutna inkubacija. Med njo se substrat obarva, zato lahko po končani inkubaciji izmerimo

absorbanco. Pred merjenjem se doda 1M fosforjevo kislino, da ustavi reakcijo med encimom in substratom. Absorbanca je v tem primeru obratno sorazmerna s koncentracijo. To pomeni, večja ko je absorbanca, manjša je koncentracija 8-OH-dG v vzorcu oz. standardu, in obratno-manjša ko je absorbanca večja, je koncentracija 8-OH-dG. Absorbanco merimo pri 450 nm s primernim spektrofotometrom.

Metoda ELISA se uporablja za določevanje koncentracije antigenov in protiteles. Za to metodo lahko uporabimo dvoje ali več vrst protiteles (Slika 6). Če uporabimo manj protiteles, ni tako natančna, če uporabimo več protiteles, lahko postane predraga.

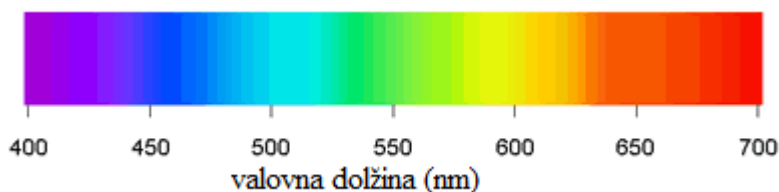


Slika 6: Prikaz metode ELISA z manj vrstami protiteles

3.5 PRINCIP MERJENJA ABSORBANCE

Za določitev koncentracije po metodi ELISA smo uporabili absorpcijsko spektroskopijo.

Za merjenje absorpcije se uporablja svetloba z določeno valovno dolžino (izberemo primerno valovno dolžino navadno v intervalu od 200 – 800 nm, to je ultravijoličnem – vidnem področju (UV – VIS)). Valovna dolžina, ki jo izberemo, ima tudi določeno energijo. Manjša ko je valovna dolžina, večja je energija. Energija, ki je posledica valovne dolžine, vzbuja molekule ali elektrone v osnovnem stanju (oziroma v stanju, ki ima najnižjo možno energijo), da preidejo v vzbujeno stanje. S tem dobimo absorpcijski spekter (Slika 7).



Slika 7: Absorpcijski spekter z valovno dolžino

Ker absorpcije ne moremo meriti neposredno, merimo prepustnost svetlobe (transmitanco). Transmitanco merimo tako, da izmerimo žarek svetlobe, ki preide preiskovani vzorec. Vstopni žarek ali žarek pred preiskovano raztopino predstavlja vrednost 1. Žarek, ki ga preiskovana raztopina prepusti, merimo in dobimo novo vrednost žarka. To vrednost izmerimo. Če je izmerjena vrednost 1, pomeni, da je transmitanca 100 % in ni absorpcije svetlobe (to je pri slepem vzorcu). Če pa je vrednost 0, pa pomeni, da je transmitanca 0 % in absorpcija svetlobe je popolna. Transmitanco vedno podajamo v odstotkih. Izračunamo jo po naslednji enačbi:

$$T = (I/I_0) * 100$$

I intenziteta prepuščenega žarka

I₀ intenziteta vstopnega žarka

Kot smo že prej omenili, ne merimo absorpcije, temveč transmitanco. Absorbanca in transmitanca sta povezani med seboj. Povezavo med njima prikazuje naslednja formula:

$$A = - \log T$$

Merjenje absorbance ima pomen šele tedaj, ko z njo lahko določimo koncentracijo. Po Beer-Lambertovem zakonu je absorbanca proporcionalna (sorazmerna) koncentraciji. To vidimo v tej enačbi:

$$A = \varepsilon * b * c$$

A absorbanca

ε molarna absorptivnost [L * mol⁻¹ * cm⁻¹]

b dolžina poti žarka skozi preiskovano raztopino [cm]

c koncentracija raztopine

3.5.1 Pomembnejši deli spektrofotometra

Vir svetlobe: Na začetku spektrofotometra je postavljen vir svetlobe (ob katerem je v nekaterih spektrofotometrih zrcalo, da se vsa svetloba usmeri v preiskovano raztopino). Kot vir svetlobe v UV-VIS območju (200-800 nm) se najpogosteje uporabljata živosrebrna in devterijeva sijalka (žarnica). Devterijeva žarnica se uporablja predvsem v UV-območju pod 350 nm, medtem ko se živosrebrna žarnica uporablja tako v UV kot v vidnem območju.

Monokromator: Naloga monokromatorja je, da skozi izhodno režo spusti le žarek z določeno valovno dolžino. Poznamo več vrst monokromatorjev. Filtri so cenovno ugodni, a niso povsem primerni, saj spustijo velik del svetlobe, ki je ne želimo. Ravno tako lahko za monokromator uporabimo prizme. Bela svetloba se na njej ukloni oziroma razprši. Prizmo lahko obračamo ter tako izberemo valovno dolžino, ki nam najbolj ustreza. Da imamo samo želeno valovno dolžino, nam omogoča izstopna reža

Vzorčna celica: Ko svetlobni žarek zapusti monokromator, potuje naprej do vzorčne celice ali kivete. Vzorčne celice, ki jih uporabljamo, morajo biti primerne glede na valovno dolžino. Navadne steklene kivete se uporabljajo v vidnem območju, saj za UV-območje niso primerne. Za merjenje v tem območju se uporabljajo kivete, ki so narejene iz kvarčnega stekla. Da izmerimo pravo absorbanco, mora biti kiveta na straneh, kjer žarek vstopa in izstopa, čista (brez prstnih odtisov, kapljic), merjena raztopina pa ne sme vsebovati mehurčkov in drugih snovi, ki bi motile merjenje absorbance.

Detektor: Poznamo več vrst detektorjev: fotocelice, fotopomnoževalke, fotodiode in druge. Fotocelice so največkrat uporabljene v spektrofotometrih, ki uporabljajo filtre kot monokromatorje. Te celice so sestavljene iz plasti (filmov), ki so občutljive na svetlobo. Fotopomnoževalke so najbolj občutljiv detektor. Občutljivost je največja, ker vsak vzbujen elektron nato vzbudi še naslednjega, saj energija vzbujenega elektrona ravno tako vpliva na elektron, ki je v osnovnem stanju. Fotodiode se posamično odzovejo na valovno dolžino (ki ustreza tej diodi), ki preide iz vzorca. Skupno vsem detektorjem je, da energijo prepuščene svetlobe (valovne dolžine) pretvorijo v električni signal (19).

Obdelava rezultatov in njihov prikaz: Računalnik, ki je povezan s spektrofotometrom, nam obdela rezultate detektorja in nam jih prikaže na zaslonu.

3.6 DOLOČEVANJE KREATININA

Kreatinin se je meril v urinu z metodo, ki uporablja alkaljski pikrat, oz. z Jaffejevo metodo.

Kreatinin + pikrinska kislina → kompleks kreatinin-pikrat

Metoda ni specifična. Lažno negativne koncentracije daje bilirubin. Protein, glikoza, askorbinska kislina, α -ketokislina, sečna kislina, aceton, ipd. Imenujemo jih psevdokreatinini in lažno zvišajo koncentracijo kreatinina.

Za izognitev lažnim rezultatom je Jaffejeva metoda modificirana na način:

- adsorpcija kreatinina na aluminijev silikat
- adsorpcija na ionske izmenjevaljce
- metode z deproteinizacijo
- kinetične metode (uporabljena na analizatorju)

Merjenje kompleksa kreatinin-pikrat poteka v intervalu 20-80 sekund, saj nekateri psevdokreatinini absorbirajo pred 20 sekundami (glukoza, askorbinska kislina), nekateri pa po 80 sekundah (proteini).

3.6.1 Analizator Roche/Hitachi 917

Samo merjenje kompleksa je potekalo na avtomatiziranem kemičnem analizatorju Roche/Hitachi 917. Uporablja se za *in vitro* kvantitativno in kvalitativno določanje analitov v urinu, krvi in drugih telesnih tekočinah. Z njim pa ne določamo le kreatinina, določamo tudi bilirubin, holesterol, železo ter druge analite. Metoda merjenja je spektrofotometrična, sloni pa na merjenju absorbance.

Analizator je sestavljen iz nadzorne in analitične enote. Nadzorno enoto predstavljajo računalnik, barvni zaslon na dotik, tipkovnica in tiskalnik. Analitična enota pa vsebuje fotometrični merilni sistem ter ionoselektivno elektrodo.

3.7 STATISTIČNE METODE

V statističnem programu SPSS 17.0 smo najprej izračunali aritmetično sredino in frekvenco porazdeljevanja podatkov ter si to tudi ogledali v primernem grafu. Z grafom smo želeli opaziti, če se nam podatki razporejajo normalno (Gaussova porazdelitev). Da bi dokazali normalno porazdeljevanje smo opravili Kolmogorov-Smirnov test. Ta test nam je ovrgel normalnost porazdeljevanja, zato smo podatke logaritmirali (podatki se nahajajo v prilogi). Nato smo ponovno opravili Kolmogorov-Smirov test, ki je sedaj dokazal, da se podatki normalno porazdeljujejo. Zato bomo naprej operirali z logaritmiranimi vrednostmi. Kolmogorov-Smirov test smo opravili tudi posebej za dekleta in dečke pri vsaki osnovni šoli.

Otroke iz iste OŠ smo primerjali med seboj s t-test.

Ob primerjanju otrok med osnovnimi šolami smo opravili Levenejev test za homogenost varianc. Temu testu je sledil test ANOVA, ki nam je povedal, če se skupine med seboj razlikujejo. V primeru razlikovanja smo opravili še Bonferrini ali Games-Howellov test.

Vse teste smo opravili pri 0,05 stopnji tveganja.

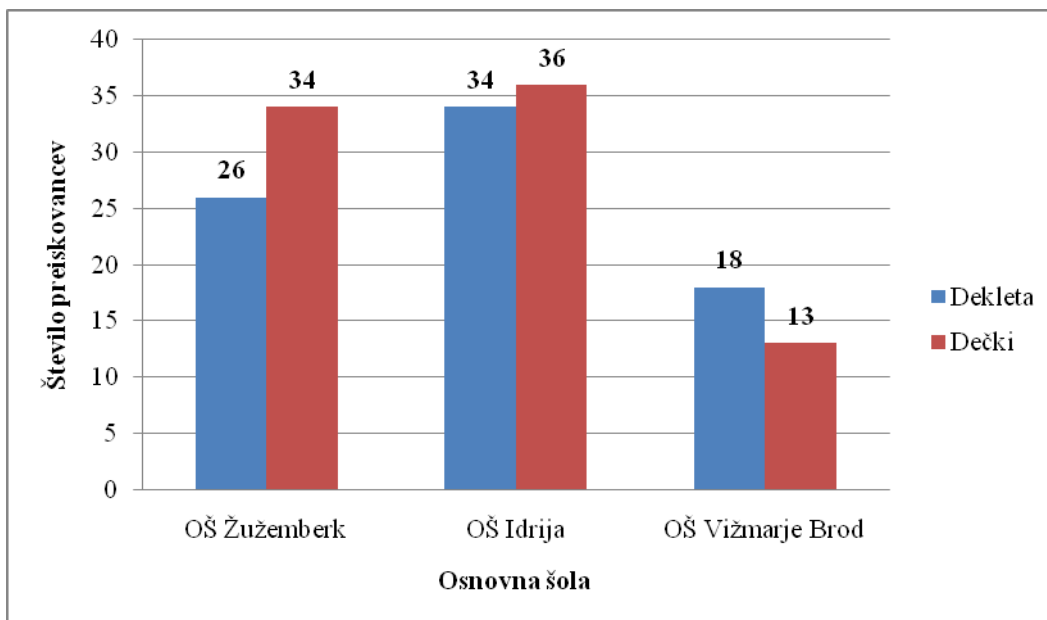
4 REZULTATI

161 otrok, ki je sodelovalo v tej raziskavi, smo najprej razdelili na tri skupine, glede na kraj obiskovanja osnovane šole (OŠ): OŠ Žužemberk, OŠ Idrija, OŠ Vižmarje Brod. Nato smo otroke iz posamezne OŠ razdelili še po spolu.

Najprej smo izračunali povprečno logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG za posamezno OŠ. Temu je sledilo primerjanje otrok iz iste OŠ. Da bi dokazali razlike med otrok OŠ, smo primerjali še šole med sabo, primerjali pa smo tudi deklice ter dečke med šolami.

4.1 REZULTATI PO SKUPINAH

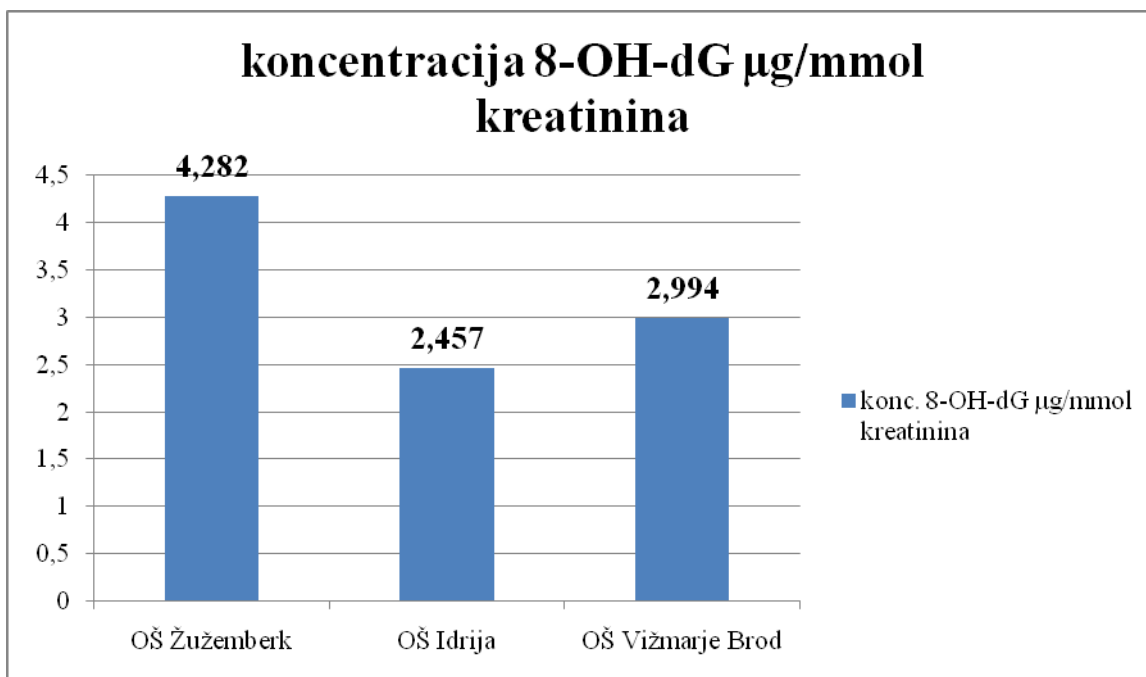
Prvo skupino predstavljajo otroci OŠ Žužemberk. Tu je bilo vseh preiskovancev 60, od tega je bilo 26 deklet in 34 dečkov. OŠ Idrija predstavlja drugo skupino preiskovancev. V njej je 34 deklet in 36 dečkov, skupaj pa predstavljajo kar 70 preiskovancev. Tretjo skupino predstavlja 31 preiskovancev OŠ Vižmarje Brod – tu je 18 deklet in 13 dečkov.



Graf 1: Število preiskovancev glede na kraj prebivanja

Iz Grafa 1 lahko opazimo, da največ preiskovanih otrok prihaja iz okolja, onesnaženega z živim srebrom, in to področje pokriva OŠ Idrija. Najmanj preiskovancev prihaja iz OŠ Vižmarje Brod, ki predstavljajo otroke iz mestnega okolja.

Povprečna koncentracija glede na kraj prebivanja je prikazana v grafu (Graf 2).



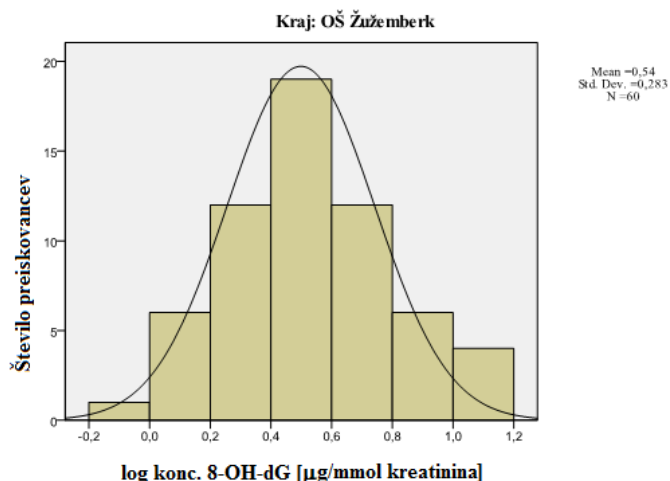
Graf 2: Povprečna koncentracija 8-OH-dG glede na kraj osnovne šole

Iz Grafa 2 je razvidno, da imajo otroci OŠ Žužemberk najvišjo koncentracijo 8-OH-dG, ki znaša 4,282 µg/mmol kreatinina, otroci drugih dveh skupin pa imajo nižjo in med seboj podobno koncentracijo. Najnižjo koncentracijo imajo otroci, ki prihajajo iz OŠ Idrija, saj je vrednost 8-OH-dG 2,457 µg/mmol kreatinina, medtem ko imajo otroci iz OŠ Vižmarje Brod povprečno koncentracijo 8-OH-dG malo višjo 2,994 µg/mmol kreatinina.

4.1.1 Osnovna šola Žužemberk

Za prvo preiskovano OŠ smo izbrali otroke, ki so izpostavljeni pesticidom. Ti otroci obiskujejo OŠ Žužemberk. Sodelovalo je 60 otrok, 24 deklet in 36 dečkov.

Dobljene vrednosti koncentracije 8-OH-dG smo najprej predstavili v histogramu (Graf 1).



Graf 3: Prikaz števila preiskovancev glede na njihovo logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG v urinu

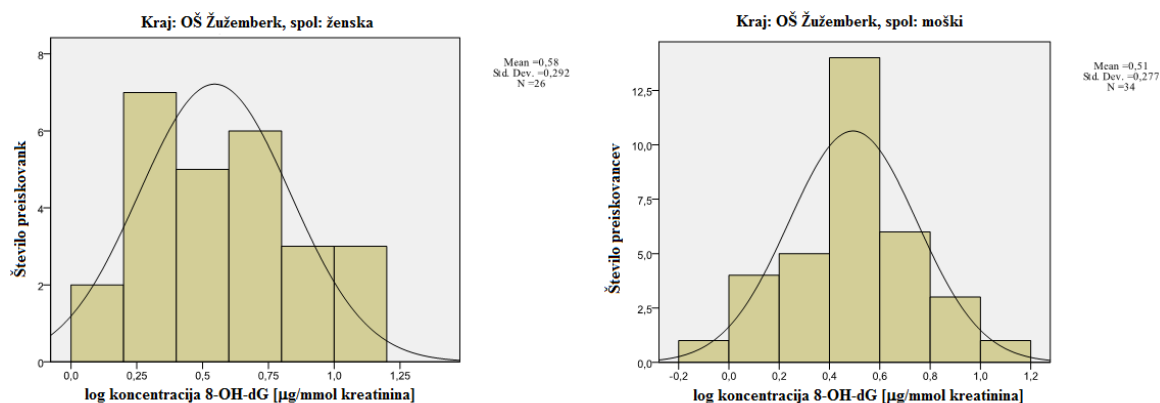
Iz samega grafa ne moremo z gotovostjo trditi, da se rezultati porazdeljujejo normalno (Gaussovi krivulji), zato smo v ta namen v statističnem programu SPSS 17.0 opravili Kolmogorov-Smirov test. Z njim smo dokazali normalno porazdeljevanje koncentracij 8-OH-dG (Preglednica I).

Preglednica I: Kolmogorov-Smirovtest za OŠ Žužemberk

| | log koncentracija 8-OH-dG (µg/mmol kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 60 |
| povprečna vrednost | ,538 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,658 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,779 |

V tem testu smo izračunali tudi povprečno koncentracijo 8-OH-dG 0,538 µg/mmol kreatinina. Normalnost porazdeljevanja smo dokazali s tem, ko je vrednost 0,779 večja od vrednosti 0,05. Vrednost 0,05 smo vzeli kot stopnjo tveganja za statistično značilnost.

Ko smo učence razdelili po spolu smo ponovno želeli vedeti, ali se njihove vrednosti porazdeljujejo normalno okrog njihove povprečne vrednosti. Tako smo najprej podatke predstavili v Grafu 4 in nato opravili še Kolmogorov-Smirov test za deklice (Preglednica II) in dečke (Preglednica III).



Graf 4: Levo: Prikaz števila preiskovank z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu; desno: Prikaz števila preiskovancev z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu

Preglednica II: Kolmogorov-Smirnov test za dekleta OŠ Žužemberk

| | log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|--|
| število preiskovank | 26 |
| povprečna vrednost | ,557 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,393 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,998 |

Kraj = OŠ Žužemberk, Spol = ženski

Preglednica III: Kolmogorov-Smirnov test za dečke OŠ Žužemberk

| | log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|--|
| število preiskovancev | 34 |
| povprečna vrednost | ,508 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,772 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,590 |

Kraj = OŠ Žužemberk, Spol = moški

S tema grafoma in pripadajočima testoma smo dokazali, da se logaritmirane vrednosti porazdeljujejo normalno, saj je stopnja značilnosti za dekleta 0,998, za dečke 0,590 in sta obe vrednosti sta večji od kritične vrednosti 0,05. V testu smo opazili, da se vrednosti pri grafu deklic bolj približujejo teoretični normalni porazdelitvi kot vrednosti pri grafu dečkov.

T-test smo opravili z namenom, da statistično dokažemo, da se deklice in dečki med seboj ne razlikujejo (Preglednica IV).

Preglednica IV: t-test za dečke in deklice OŠ Žužemberk

| | | Levenejev test homogenosti varianc | | t-test | | |
|------------------------------|---------------------|------------------------------------|------------------|--------|-------------------|-----------------------------|
| | | F | Stopnja zaupanja | t | Stopnja prostosti | p-vrednost dvostranski test |
| log koncentracija | Homogene variance | ,633 | ,429 | -,935 | 58 | ,354 |
| 8-OH-dG (μg/mmol kreatinina) | Nehomogene variance | | | -,929 | 52,487 | ,357 |

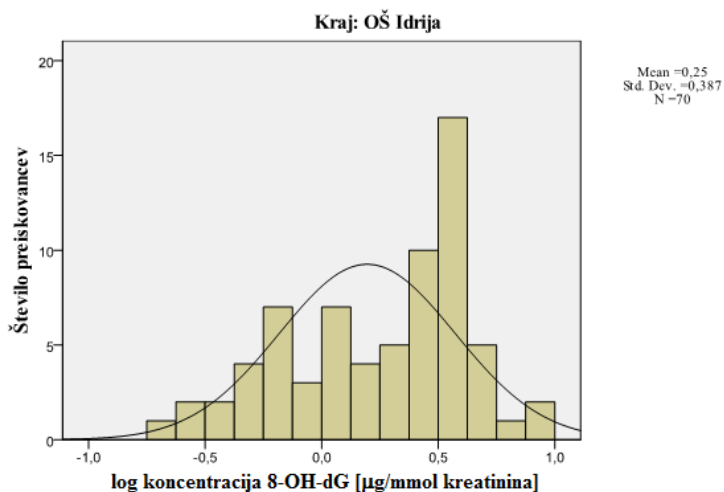
V Preglednici IV lahko vidimo, da so variance teh otrok homogene, saj je njihova vrednost 0,429 večja od vrednosti 0,05. Vrednost 0,05 predstavlja stopnjo tveganja. Iz t-testa je razvidno, da se deklice in dečki med seboj ne razlikujejo, kar potrjuje vrednost 0,354, ki je večja od stopnje tveganja.

Iz OŠ Žužemberk je sodelovalo 60 učencev, njihova povprečna vrednost koncentracije je bila 0,538, nelogaritmirana vrednost pa 4,282 μg/mmol kreatinina (podatki so vidni v prilogi). Pri dekletih povprečna koncentracija 8-OH-dG znaša 0,577 nelogaritmirana vrednost pa je 4,719 μg/mmol kreatinina, kar pomeni višjo koncentracijo od povprečne koncentracije OŠ Žužemberk. Dečki imajo povprečno vrednost 3,947 μg/mmol kreatinina, če jo logaritmiramo, dobimo vrednost 0,508, torej nižjo koncentracijo od povprečja OŠ Žužemberk. Z dobljenimi logaritmiranimi vrednostmi koncentracije 8-OH-dG smo dokazali, da se deklice in dečki med seboj ne razlikujejo.

4.1.2 Osnovna šola Idrija

34 deklet in 36 dečkov skupaj predstavlja 70 preiskovancev. Ti učenci živijo okolju onesnaženim z živim srebrom, ter obiskujejo OŠ Idrija.

Logaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG predstavlja Graf 5. Poleg krivulje, ki predstavlja normalno porazdeljevanje, vidimo tudi histogram. V njem lahko vidimo, koliko preiskovancev ima enako vrednost koncentracije.



Graf 5: Prikaz števila preiskovancev glede na njihovo logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG v urinu

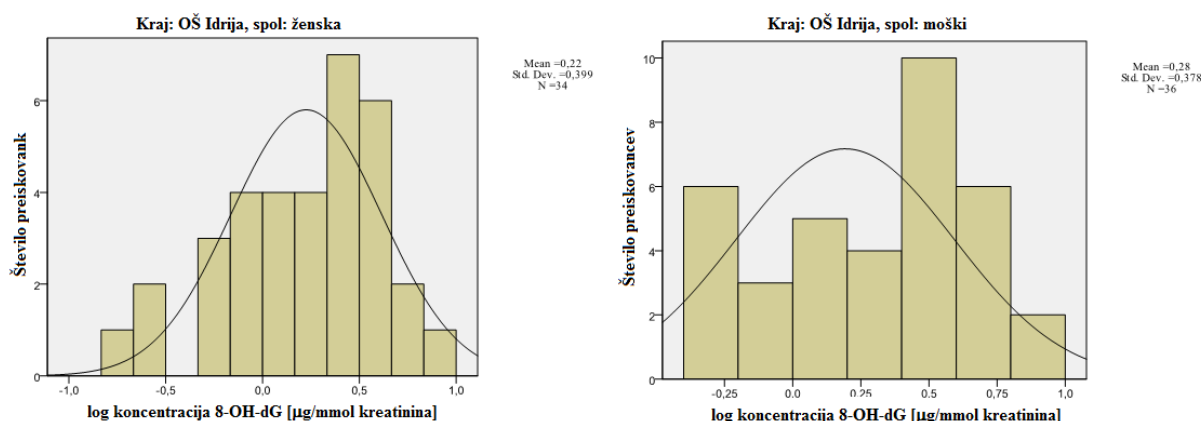
Pri tej skupini je Kolmogorov-Smirov test dokazal normalno porazdeljevanje logaritmiranih vrednosti koncentracije 8-OH-dG. Naša dobljena vrednost 0,137, je večja od 0,05 stopnje tveganja. Vrednosti koncentracije otrok iz OŠ se normalno porazdeljujejo okrog aritmetične sredine, ki je 0,248 (Preglednica V).

Preglednica V: Kolmogorov-Smirnov test za OŠ Idrija

| | log koncentracija 8-OH-dG (µg/mmol kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 70 |
| povprečna vrednost | ,248 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,158 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,137 |

Kraj = OŠ Idrija

Kako se logaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG porazdeljujejo pri deklicah in dečkih OŠ Idrija, prikazuje Graf 6.



Graf 6: Levo: Prikaz števila preiskovank z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu; desno: Prikaz števila preiskovancev z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu

Kolmogorov-Smirov test smo opravili tudi za deklice (Preglednica VI) in dečke (Preglednica VII). Test je pri obeh skupinah pokazal, da se podatki kljub različnim spoloma porazdeljujejo normalno. Vrednost 0,453, ki jo opazimo pri dekletih, odraža boljši približek teoretični porazdelitvi kot pri dečkih, kjer je vrednost 0,188.

Preglednica VI: Kolmogorov-Smirov test za deklice Oš Idrija

| | log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|--|
| število preiskovank | 34 |
| povprečna vrednost | ,215 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,858 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,453 |

Kraj = Oš Idrija, Spol = ženski

Preglednica VII: Kolmogorov-Smirnov test za dečke Oš Idrija

| | log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|--|
| število preiskovancev | 36 |
| povprečna vrednost | ,279 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,087 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,188 |

Kraj = Oš Idrija, Spol = moški

Za deklice in dečke te OŠ smo opravili t-test pri stopni zaupanja $p = 0,05$ (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: t-test za deklice in dečke OŠ Idrija

| | | Levenejev test homogenosti varianc | | t-test | | |
|---|---------------------|------------------------------------|------------------|--------|-------------------|-----------------------------|
| | | F | Stopnja zaupanja | t | Stopnja prostosti | p-vrednost dvostranski test |
| log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) | Homogene variance | ,001 | ,969 | ,685 | 68 | ,496 |
| | Nehomogene variance | | | ,684 | 67,193 | ,497 |

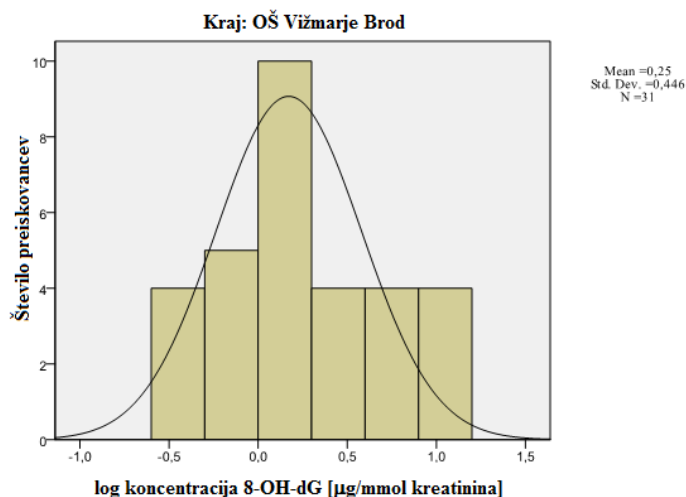
Pri deklicah in dečkih OŠ Idrija sta varianci skoraj homogeni saj je njuna vrednost 0,969 kar je blizu 1, ki predstavlja homogenost. Ravno tako se ti otroci ne razlikujejo po spolu njihova vrednost 0,496 je večja od stopnje tveganja 0,05.

Pri tej skupini smo določili koncentracijo 8-OH-dG v urinu 70 otrok, starih 7-11 let, ki prihajajo iz OŠ Idrija. Povprečna vrednost logaritmiranih koncentracij 8-OH-dG je 0,248, nelogaritmirana vrednost je 2,457 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Povprečna vrednost za dekleta znaša 0,215, nelogaritmirana vrednost pa 2,312 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Dečki imajo povprečno koncentracijo 0,279. Nelogaritmirana vrednost koncentracije 8-OH-dG je 2,594 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Z logaritmiranimi vrednostmi koncentracij 8-OH-dG smo dokazali, da se učenci OŠ Idrija med seboj ne razlikujejo.

4.1.3 Osnovna šola Vižmarje Brod

Iz Osnovne šole Vižmarje Brod je sodelovalo 18 deklic in 13 dečkov. Otroci, ki obiskujejo to šolo, so v večji meri izpostavljeni izpušnim plinom.

Dobljene rezultate koncentracije 8-OH-dG smo logaritmirali ter jih predstavili v spodnjem Grafu št 7.



Graf 7: Prikaz števila preiskovancev glede na njihovo logaritmirano vrednost koncentracije 8-OH-dG v urinu.

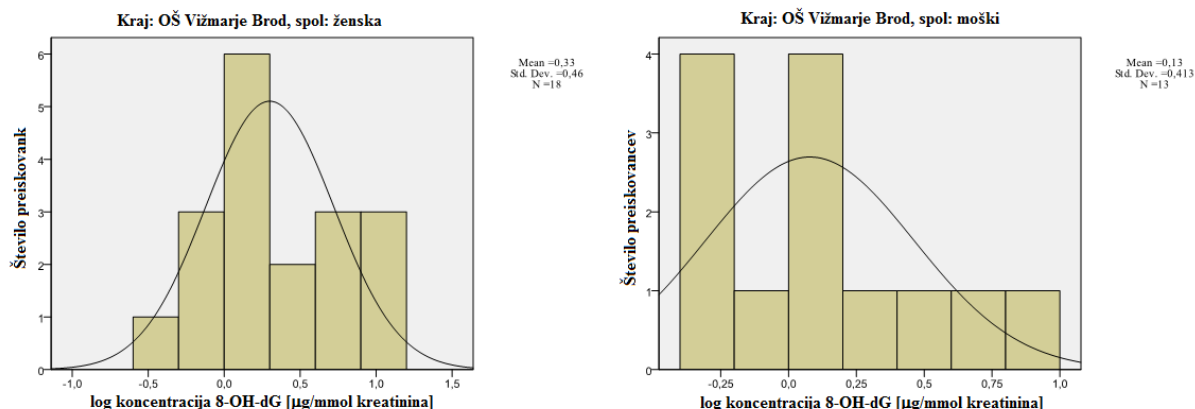
Vrednost Kolmogorov-Smirov-ega testa za zgornji graf je 0,674 kar dokazuje, da se vrednosti porazdeljujejo normalno (Preglednica IX).

Preglednica IX: Kolmogorov-Smirnov test za OŠ Vižmarje Brod

| | log koncentracija 8-OH-dG (µg/mmol kreatinina) |
|-----------------------------|---|
| število preiskovancev | 31 |
| povprečna vrednost | ,249 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,722 |
| p-vrednost (dvosmerni test) | ,674 |

Kraj = OŠ Vižmarje Brod

Graf 8 prikazuje kako se logaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG porazdeljujejo pri deklicah in dečkih.



Graf 8: Levo: Prikaz števila preiskovank z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu; desno: Prikaz števila preiskovancev z enako logaritmirano vrednostjo koncentracije 8-OH-dG v urinu

Kolmogorov-Smirov test smo opravili tudi za dekleta (Preglednica X) in dečke (Preglednica XI). Pri obeh skupinah smo dobili podobne rezultate porazdeljevanja. Dekleta imajo vrednost 0,843 ter dečki 0,807. S tem smo potrdili, da se podatki porazdeljujejo po Gaussovi krivulji.

Preglednica X: Kolmogorov-Smirnov test za dekleta OŠ Vižmarje Brod

| | log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|--|
| število preiskovank | 18 |
| povprečna vrednost | ,335 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,615 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,843 |

Kraj = OŠ Vižmarje Brod, Spol = ženski

Preglednica XI: kolmogorov - Smirnov test za dečke OŠ Vižmarje Brod

| | log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|--------------------------------|--|
| število preiskovancev | 13 |
| povprečna vrednost | ,131 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,640 |
| p- vrednost (dvostranski test) | ,807 |

Kraj = OŠ Vižmarje Brod, Spol = moški

Tudi pri otrocih OŠ Vižmarje Brod smo opravili t-test z namenom, da dokažemo, da se otroci po spolu ne razlikujejo (Preglednica XII).

Preglednica XII: t-test za deklice in dečke OŠ Vižmarje Brod

| | | Levene-jev test homogenosti varianc | | t-test | | |
|---|---------------------|-------------------------------------|------------------|--------|-------------------|-----------------------------|
| | | F | Stopnja zaupanja | t | Stopnja prostosti | p-vrednost dvostranski test |
| log koncentracija | Homogene variance | ,419 | ,523 | -1,268 | 29 | ,215 |
| 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) | Nehomogene variance | | | -1,291 | 27,555 | ,207 |

Iz Preglednice XII je razvidno, da sta varianci za te deklice in dečke homogeni, vrednost 0,523 je večja od stopnje zaupanja 0,05. P-vrednost t testa je 0,215 in je večja od vrednosti 0,05, zato lahko trdimo, da se v tej osnovni šoli deklice ne razlikujejo od dečkov.

Otroke iz urbanega okolja je predstavljalo 18 deklic in 13 dečkov. Vseh 31 učencev obiskuje OŠ Vižmarje Brod. Njihova povprečna koncentracija 8-OH-dG je 0,249. Če koncentracij ne bi logaritmirali, bi bila njihova povprečna koncentracija 2,994 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Deklice iz te šole imajo povprečno vrednost 0,335. Koncentracija je nekoliko višja od povprečja, ki ga ima OŠ Vižmarje Brod. Povprečna vrednost nelogaritmirane koncentracije je 3,628 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Dečki iz te skupine imajo povprečno vrednost 0,131. Nelogaritmirane vrednosti koncentracije bi pokazale povprečje pri 2,115 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Ravno tako kot prejšnjih dveh skupinah smo tudi v tej OŠ dokazali, da se skupine med seboj po spolu ne razlikujejo.

4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMI

4.2.1 Primerjava rezultatov osnovnih šol med seboj

Najprej bomo med seboj primerjali šole, da bomo videli, če se koncentracija 8-OH-dG pri otrocih iz različnih šol sploh razlikuje.

Vrednost variance ima vsaka šola drugačno. Zato smo tudi tukaj opravili Levenejev test homogenosti varianc (Preglednica XIII). Dobljena vrednost 0,001 je manjša od stopnje tveganja, ki ima vrednost 0,05. Iz tega sledi da si variance niso homogene.

Preglednica XIII: Levenejev test homogenosti varianc

log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| Levene Statistic | Stopnja prostosti (osnovne šole) | Stopnja prostosti (preiskovanci) | Stopnja zaupanja |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|
| 7,635 | 2 | 158 | ,001 |

Naslednji test, ki smo ga opravili, je bil ANOVA. Namen tega testa je odkritje razlik med skupinami. Naša vrednost testa je $<0,001$, kar je manj od kritične vrednosti 0,05 (Preglednica XIV). S tem, ko je naša vrednost manjša od kritične vrednosti je dokazana razlika med osnovnimi šolami.

Preglednica XIV: Test ANOVA za vse tri osnovne šole

log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| | Vsota kvadratov odklona od aritmetične sredine | Stopnje prostosti | Varianca | F | Stopnja zaupanja |
|------------|--|-------------------|----------|--------|------------------|
| Med OŠ | 3,165 | 2 | 1,582 | 11,894 | ,000 |
| Znotraj OŠ | 21,020 | 158 | ,133 | | |
| Skupaj | 24,184 | 160 | | | |

Iz samega testa ANOVA ne moremo vedeti, med katerimi OŠ je razlika, zato bomo to dokazali z naslednjim testom. Ker smo z Levenejevim testom ugotovili, da se variance med seboj razlikujejo, smo se odločili za test Games-Howella. Ta nam namreč pokaže, med katerimi šolami je statistično značilna razlika.

Preglednica XV: Games-Howellov test za vse tri osnovne šole

Odvisna spremenljivka: log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| | (I) Kraj | (J) Kraj | Pomembna razlika (I-J) | Standardna napaka | Stopnja zaupanja | 95% interval zaupanja | |
|------------------|--------------|------------------|------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|--------------|
| | | | | | | Spodnja meja | Zgornja meja |
| Games-Howell | OŠ Žužemberk | OŠ Idrija | ,2903* | ,0590 | ,000 | ,150 | ,430 |
| | | OŠ Vižmarje Brod | ,2891* | ,0880 | ,006 | ,075 | ,503 |
| | OŠ Idrija | OŠ Žužemberk | -,2903* | ,0590 | ,000 | -,430 | -,150 |
| | | OŠ Vižmarje Brod | -,0012 | ,0924 | 1,000 | -,224 | ,222 |
| OŠ Vižmarje Brod | OŠ Žužemberk | -,2891* | ,0880 | ,006 | -,503 | -,075 | |
| | | OŠ Idrija | ,0012 | ,0924 | 1,000 | -,222 | ,224 |

* Test je opravljen pri stopnji tveganja 0,05

Iz Preglednice XV je razvidno, da se OŠ Žužemberk statistično razlikuje od drugih dveh šol. Signifikantno se razlikuje, saj ima vrednosti pod 0,05. Vrednost glede na OŠ Idrija je $<0,001$. Vrednost glede na OŠ Vižmarje Brod je 0,006. OŠ Idrija in OŠ Vižmarje Brod se statistično značilno ne razlikujeta, saj je njuna signifikantna vrednost 1.

4.2.2 Primerjava rezultatov deklet med osnovnimi šolami

Pri primerjavi rezultatov deklet iz različnih šol smo ravno tako opravili Levenejev test homogenosti varianc. Vrednost, ki smo jo dobili, znaša 0,071, kar pomeni, da so variance homogene (Preglednica XVI). Naša vrednost je večja od kritične vrednosti 0,05.

Preglednica XVI: Levenejev test homogenosti varianc za dekleta

log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| Levene Statistic | Stopnja prostosti (osnovne šole) | Stopnja prostosti (preiskovanke) | Stopnja zaupanja |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|
| 2,735 | 2 | 75 | ,071 |

Pri testu ANOVA smo ravno tako opazili, da je signifikantna razlika med dekleti. Vrednost 0,002, ki smo jo dobili, je namreč manjša od vrednosti 0,05, ki je kritična vrednost (Preglednica XVII).

Preglednica XVII: Test ANOVA za dekleta

log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| | Vsota kvadratov odklona od aritmetične sredine | Stopnja prostosti | Varianca | F | Stopnja zaupanja |
|------------|--|-------------------|----------|-------|------------------|
| Med OŠ | 1,952 | 2 | ,976 | 6,671 | ,002 |
| Znotraj OŠ | 10,973 | 75 | ,146 | | |
| Skupaj | 12,925 | 77 | | | |

Da bi videli, katera dekleta se razlikujejo med sabo, smo se odločili za Bonferronijev test (Preglednica XVIII). Ta test smo izbrali na podlagi homogenosti varianc. Iz slike je razvidno, da se razlikujejo dekleta OŠ Žužemberk in OŠ Idrija. Njihova signifikantna vrednost znaša 0,02. Medtem ko se dekleta OŠ Vižmarje Brod statistično signifikantno ne razlikujejo od deklet iz drugih dveh šol.

Preglednica XVIII: Bonferroni test za dekleta

Odvisna spremenljivka: log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| | (I) Kraj | (J) Kraj | Pomembna razlika (I-J) | Standardna napaka | Stopnja zaupanja | 95% interval zaupanja | |
|------------------|--------------|------------------|------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|--------------|
| | | | | | | Spodnja meja | Zgornja meja |
| Bonferroni | OŠ Žužemberk | OŠ Idrija | ,3622* | ,0997 | ,002 | ,118 | ,606 |
| | | OŠ Vižmarje Brod | ,2429 | ,1173 | ,125 | -,044 | ,530 |
| | OŠ Idrija | OŠ Žužemberk | -,3622* | ,0997 | ,002 | -,606 | -,118 |
| | | OŠ Vižmarje Brod | -,1193 | ,1115 | ,864 | -,392 | ,154 |
| OŠ Vižmarje Brod | OŠ Žužemberk | -,2429 | ,1173 | ,125 | -,530 | ,044 | |
| | OŠ Idrija | ,1193 | ,1115 | ,864 | -,154 | ,392 | |

* Pomembna razlika pri stopnji tveganja 0,05

4.2.3 Primerjava rezultatov dečkov med osnovnimi šolami

Tudi pri dečkih teh treh šol smo najprej naredili Levenejev test, katerega stopnja zaupanja je 0,018 in z njim smo pokazali, da si variance niso homogene (Preglednica XIX).

Preglednica XIX: Levenejev test homogenosti varianc za dečke

log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| Levene Statistic | Stopnja prostosti (osnovne šole) | Stopnje prostosti (preiskovanci) | Stopnja zaupanja |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|
| 4,245 | 2 | 80 | ,018 |

Ko smo opravili še test ANOVA, smo videli, da se med seboj statistično značilno razlikujejo (Preglednica XX).

Preglednica XX: Test ANOVA za dečke

log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| | Vsota kvadratov odklona od aritmetične sredine | Stopnja prostosti | Varianca | F | Stopnja zaupanja |
|------------|--|-------------------|----------|-------|------------------|
| Med OŠ | 1,659 | 2 | ,829 | 6,917 | ,002 |
| Znotraj OŠ | 9,593 | 80 | ,120 | | |
| Skupaj | 11,252 | 82 | | | |

Ker smo z Levenejevim testom dokazali nehomogenost varianc, smo se odločili, da ponovno uporabimo Games-Howellov test (Preglednica XXI), da ugotovimo, kateri dečki se razlikujejo. Iz slike je razvidno, da se dečki OŠ Žužemberk statistično značilno razlikujejo od svojih sovrstnikov drugih dveh osnovnih šol. Dečki OŠ Idrija in OŠ Vižmarje Brod se statistično ne razlikujejo.

Preglednica XXI: Games-Howellov test za dečke

Odvisna spremenljivka: log koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)

| (I) Kraj | (J) Kraj | Pomembna razlika (I-J) | Standardna napaka | Stopna zaupanja | 95% interval zaupanja | |
|------------------|------------------|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| | | | | | Spodnja meja | Zgornja meja |
| Games-Howell | OŠ Žužemberk | ,2295* | ,0790 | ,014 | ,040 | ,419 |
| | OŠ Idrija | ,3774* | ,1239 | ,020 | ,058 | ,697 |
| OŠ Idrija | OŠ Žužemberk | -,2295* | ,0790 | ,014 | -,419 | -,040 |
| | OŠ Vižmarje Brod | ,1479 | ,1307 | ,506 | -,183 | ,479 |
| OŠ Vižmarje Brod | OŠ Žužemberk | -,3774* | ,1239 | ,020 | -,697 | -,058 |
| | OŠ Idrija | -,1479 | ,1307 | ,506 | -,479 | ,183 |

* Pomembna razlika pri stopnji tveganja 0,05

5 RAZPRAVA

Uporabili smo 161 vzorcev urina, pridobljenega od otrok, starih 7 – 11 let, ki obiskujejo tri različne osnovne šole, Osnovno šolo Žužemberk, Osnovno šolo Idrija in Osnovno šolo Vižmarje Brod.

60 otrok prihaja iz okolja, ki je bolj izpostavljeno pesticidom in obiskuje OŠ Žužemberk. Tu je sodelovalo 26 deklet in 34 dečkov, njihova skupna povprečna koncentracija je 4,282 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina in je nekoliko višja od povprečja drugih dveh šol. Povprečna koncentracija deklet je 4,719 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina, torej višja od povprečja dečkov, ki znaša 3,947 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Statistično smo dokazali, da se otroci iz OŠ Žužemberk me sabo po spolu ne razlikujejo. Zato lahko trdimo, da pesticidi ne vplivajo na koncentracijo 8-OH-dG pri spolu.

Iz Osnovne šole Idrija je sodelovalo 34 deklet in 36 dečkov. Ti otroci prihajajo iz okolja, ki je obremenjeno z živim srebrom. Njihova povprečna koncentracija znaša 2,457 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Povprečna koncentracija za dekleta, stara 7 – 11 let, je tu 2,312 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina, medtem ko za dečke enake starosti znaša 2,594 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Dečki imajo torej nekoliko višjo koncentracijo 8-OH-dG. Ravno tako smo dokazali, da se dečki statistično ne razlikujejo od deklic. Tako lahko trdimo, da živo srebro ne vpliva na koncentracijo 8-OH-dG pri spolu.

18 deklet in 13 dečkov, ki obiskujejo Osnovno šolo Vižmarje Brod, živi v okolju, ki je onesnaženo z izpušnimi plini. Povprečna koncentracija 8-OH-dG v urinu teh otrok je 2,994 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Povprečna koncentracija pri dekletih je 3,628 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina, kar je več od povprečne koncentracije dečkov, ki znaša 2,115 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina. Tudi pri tej skupini smo dokazali, da se otroci statistično ne razlikujejo, zato lahko sklepamo, da spol ne vpliva na koncentracijo 8-OH-dG v urinu teh otrok.

Med medsebojnim primerjanjem osnovnih šol med sabo smo ugotovili, da se otroci OŠ Žužemberk statistično razlikujejo od sovrstnikov iz drugih dveh šol. Otroci OŠ Žužemberk imajo višjo koncentracijo 8-OH-dG. Vzrok za povišano koncentracijo je lahko v času odvzema vzorca. Vzorci so bili odvzeti v mesecu juniju, ko se uporablja na poljih različna količina različnih pesticidov, zaradi česar lahko pride do povečane porabe antioksidantov in preobremenitve antioksidantnih encimov. Na drugi strani so otroci iz OŠ Idrija in OŠ Vižmarje Brod izpostavljeni določeni koncentraciji dejavnika tekom celega leta. Tako kot se med seboj razlikujejo šole se razlikujejo tudi dečki iz teh šol med sabo, medtem ko se dekleta statistično razlikujejo nekoliko drugače, saj se razlikujejo samo dekleta OŠ Žužemberk in OŠ Idrija, dekleta OŠ Vižmarje Brod pa se od drugih deklet statistično ne razlikujejo.

Ker ne poznamo točne starosti preiskovancev, ne moremo trditi, da je vrednost za celotno šolo pravilna, saj je dokazano, da se koncentracija 8-OH-dG tekom staranja povečuje. Da se povečuje, so dokazali znanstveniki, ki so v Mehiki primerjali otroke iz Mexico Cityja in manj onesnaženega mesta.. Pri tej raziskavi so ugotovili, da se otroci razlikujejo glede na kraj bivanja in glede na starost v istem kraju. Ravno tako ne vemo, v kakšnem družinskem okolju živijo ti otroci, ali so njihov družinski člani kadilci ali ne. Saj bi bili tako izpostavljeni tudi drugim dejavnikom, ki povečujejo koncentracijo 8-OH-dG. Za boljšo primerjavo izpostavljenosti otrok tem dejavnikom bi morali imeti tudi kontrolno skupino. Ta skupina otrok ne bi smela biti izpostavljena tem dejavnikom, kar pa bi bilo zelo težko.

6 SKLEP

V diplomski nalogi smo se spraševali, če se skupine med seboj razlikujejo glede na to, ali prebivajo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenim okoljem.

Dokazali smo:

- da se dekleta in dečki, ki prihajajo iz iste šole ne, razlikujejo v koncentraciji 8-OH-dG v urinu, torej spol ne vpliva na koncentracijo 8-OH-dG v urinu v istem kraju;
- da se učenci OŠ Žužemberk, gledano s stališča, da skupina predstavlja celotno šolo, razlikujejo v koncentraciji 8-OH-dG v urinu od sovrstnikov iz OŠ Idrija in OŠ Vižmarje Brod, imajo namreč višjo koncentracijo;
- da se dekleta OŠ Žužemberk in OŠ Idrija statistično razlikujejo med seboj, medtem ko se dekleta OŠ Vižmarje Brod ne razlikujejo od učenk ostalih dveh osnovnih šol;
- da imajo dečki iz OŠ Žužemberk višjo koncentracijo 8-OH-dG v urinu in se po tem razlikujejo od dečkov, ki obiskujejo OŠ Idrija in OŠ Vižmarje Brod.

V tej diplomski nalogi smo ugotovili, da nobeden od dejavnikov (pesticidi, živo srebro ali izpušni plini) bistveno ne vpliva na koncentracijo 8-OH-dG v urinu. To lahko trdimo, ker se nobena od osnovnih šol bistveno ne razlikuje od druge in ker se dekleta med sabo razlikujejo drugače kot dečki in kot se osnovne šole. Rečemo lahko le, da pesticidi močneje vplivajo na oksidacijo 2'deoksigvanozina in s tem na oksidacijo DNK kot živo srebro.

7 LITERATURA:

1. Ridley M. Genom: Biografija človeške vrste. Učila Internacional, Tržič, 2005: 15 – 34
2. Veranič P., Pšeničnik M., Romih R., Strle M., Kralj M.: Osnove celične biologije z navodili za vaje. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 51 – 53
3. Boyer R.: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 31 – 39, 243 – 300
4. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J.: Molecular cell biology, fifth edition. W.H. Freeman and Company, New York, 2004: 101 – 137
5. Devlin T. M.: Textbook of biochemistry with clinical correlations, sixth edition. Wiley-Liss, cop, New York, 2006: 176 – 188
6. http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/transcription_translati on/index.htm (dostopno: 6. 12. 2011)
7. Campbell N. A., Mitchell L.G., Reece J.B.: Biology concepts & connections, third edition. Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc., San Francisco, 2000: 192 – 201
8. Curtis H., Barnes N.S.: Invitation to Biology, fifth edition. Worth Freeman, New York, 1994: 255 – 264
9. Tortora J.G., Funke B.R., Case C.L.: Microbiology at introduction, sixth edition, Benjamin/Cummings publishing, Menlo Park, 1997: 221-226
10. Atherly A.G., Girton J.R., McDonald J.F.: The science of genetics, Saunders College, 1999: 508 – 520
11. What is oxidative stres? ,http://www.genox.com/what_is_oxidative_stress.html (dostopno: 3. 12. 2011)
12. Sedelnikova O.A., Redon C.E, Dickey J.S., Nakamura A.J., Georgakilas A.G., Bonner W.M.: Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis <http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science/article/pii/S1383574210000025> (dostopno: 29. 11. 2011)

13. Risom L., Møller P., Loft S.: Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution
<http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science/article/pii/S0027510705002460> (dostopno: 29. 11. 2011)
14. Franco R., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M., Panayiotidis M.I.: Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis Ménage à Trois
<http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science/article/pii/S1383571808003628> (dostopno: 29. 11. 2011)
15. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis, journal of environmental science and health, part C: environmental carcinogenesis and ecotoxicology reviews, 2009: 120 – 139
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10590500902885684> (dostopno: 4. 12. 2011)
16. DNA-damage Biomarker 8-OHdG "8-OHdG Check",
http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/kits/elisa/products_nns_20060421.asp?entry_id=3764 (dostopno: 6. 12. 2011)
17. Nakae D., Akai H., Kishida H., Kusuoka O., Tsutsumi M., Konishi Y.: Age and organ dependent spontaneous generation of nuclear 8-hydroxydeoxyguanosine in male fischer 344 rats
<http://www.nature.com/labinvest/journal/v80/n2/full/3780028a.html>
(dostopno: 4. 12. 2011)
18. Jeong-Soon Kim, Dae-Yong Kim, Jin-Ku Lee, Jai-Youl Ro, Myung-Hee Chung: 8-oxo-2'-deoxyguanosine suppresses allergy-induced lung tissue remodeling in mice
<http://www.sciencedirect.com.nukweb.nuk.uni-lj.si/science/article/pii/S0014299910011398> (dostopno 20. 12. 2011)
19. Bishop M. L., Fody E. P., Schoeff L. E.: Clinical chemistry principles, procedures, correlation, fifth edition, Lipponcott Williams & Wilkins, 2005; 91 – 96, 110 – 111
20. Kayoko Shimoi, Hiroshi Kasai, Naoko Yokota, Shinya Toyokuni, Naohide Kinoshita: Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked

immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in human urine

<http://cebp.aacrjournals.org/content/11/8/767.full> (dostopno: 3. 4. 2012)

21. Klinična kemija študijsko gradivo za študente Fakultete za farmacijo 1. zvezek, Ljubljana, 2003, dopolnjena izdaja 2008.

8 PRILOGE

Preglednica XXII: Dobljene koncentracije 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) v urinu otrok

| Število vzorcev | OŠ Žužembrk Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) | OŠ Idrija Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) | OŠ Vižmarje Brod Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-----------------|---|---|---|
| 1 | 14,6 | 1,0 | 5,0 |
| 2 | 1,4 | 3,5 | 9,6 |
| 3 | 2,3 | 2,6 | 8,3 |
| 4 | 1,4 | 3,4 | 5,8 |
| 5 | 14,0 | 4,1 | 4,3 |
| 6 | 1,8 | 2,3 | 2,5 |
| 7 | 2,5 | 2,6 | 1,0 |
| 8 | 6,2 | 3,6 | 3,5 |
| 9 | 5,6 | 4,6 | 4,7 |
| 10 | 3,8 | 3,1 | 0,6 |
| 11 | 2,8 | 8,3 | 1,1 |
| 12 | 9,3 | 9,0 | 0,5 |
| 13 | 2,4 | 4,2 | 1,6 |
| 14 | 9,6 | 3,7 | 14,4 |
| 15 | 4,5 | 2,8 | 3,8 |
| 16 | 1,2 | 4,0 | 0,5 |
| 17 | 3,0 | 3,5 | 0,6 |
| 18 | 3,0 | 4,7 | 0,3 |
| 19 | 2,8 | 2,6 | 0,9 |
| 20 | 2,5 | 3,4 | 0,4 |
| 21 | 4,2 | 3,3 | 1,4 |
| 22 | 3,6 | 3,8 | 0,8 |
| 23 | 3,5 | 3,5 | 0,9 |
| 24 | 4,0 | 4,3 | 1,3 |
| 25 | 2,0 | 5,2 | 9,9 |
| 26 | 0,7 | 6,4 | 1,2 |
| 27 | 3,9 | 3,5 | 2,1 |
| 28 | 4,4 | 3,4 | 1,7 |
| 29 | 8,8 | 3,1 | 1,6 |

Gladek J.: Določanje 8-hidroksidegvanozina v urinu pri otrocih glede na to, ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju

| | | | |
|----|------|-----|-----|
| 30 | 3,6 | 4,0 | 1,3 |
| 31 | 5,5 | 2,4 | |
| 32 | 2,9 | 4,5 | |
| 33 | 1,6 | 0,7 | |
| 34 | 7,1 | 1,5 | |
| 35 | 1,2 | 0,7 | |
| 36 | 4,7 | 2,5 | |
| 37 | 2,7 | 0,4 | |
| 38 | 3,7 | 2,0 | |
| 39 | 3,6 | 3,6 | |
| 40 | 4,6 | 1,1 | |
| 41 | 3,0 | 0,7 | |
| 42 | 3,2 | 0,2 | |
| 43 | 10,4 | 1,1 | |
| 44 | 3,0 | 1,6 | |
| 45 | 5,6 | 0,5 | |
| 46 | 3,2 | 0,7 | |
| 47 | 4,0 | 0,8 | |
| 48 | 1,6 | 1,8 | |
| 49 | 9,9 | 0,5 | |
| 50 | 1,7 | 0,5 | |
| 51 | 4,5 | 1,0 | |
| 52 | 2,0 | 1,5 | |
| 53 | 3,7 | 3,1 | |
| 54 | 7,9 | 0,5 | |
| 55 | 1,5 | 0,6 | |
| 56 | 3,5 | 0,8 | |
| 57 | 1,5 | 0,3 | |
| 58 | 2,3 | 2,0 | |
| 59 | 2,1 | 4,0 | |
| 60 | 11,3 | 0,3 | |
| 61 | | 1,4 | |
| 62 | | 2,0 | |
| 63 | | 0,9 | |
| 64 | | 0,6 | |
| 65 | | 1,3 | |
| 66 | | 0,6 | |
| 67 | | 2,9 | |
| 68 | | 1,2 | |
| 69 | | 1,3 | |
| 70 | | 0,4 | |

Preglednica XXIII: Logaritmirane vrednosti 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina)
(Vrednosti so bile uporabljene v diplomski nalogi.)

| Število vzorcev | OŠ Žužembrk LG 10 Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) | OŠ Idrija LG 10 Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) | OŠ Vižmarje Brod LG 10 Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-----------------|--|--|---|
| 1 | 1,16 | 0 | 0,7 |
| 2 | 0,15 | 0,54 | 0,98 |
| 3 | 0,36 | 0,41 | 0,92 |
| 4 | 0,15 | 0,53 | 0,76 |
| 5 | 1,15 | 0,61 | 0,63 |
| 6 | 0,26 | 0,36 | 0,4 |
| 7 | 0,4 | 0,41 | 0 |
| 8 | 0,79 | 0,56 | 0,54 |
| 9 | 0,75 | 0,66 | 0,67 |
| 10 | 0,58 | 0,49 | -0,22 |
| 11 | 0,45 | 0,92 | 0,04 |
| 12 | 0,97 | 0,95 | -0,3 |
| 13 | 0,38 | 0,62 | 0,2 |
| 14 | 0,98 | 0,57 | 1,16 |
| 15 | 0,65 | 0,45 | 0,58 |
| 16 | 0,08 | 0,6 | -0,3 |
| 17 | 0,48 | 0,54 | -0,22 |
| 18 | 0,48 | 0,67 | -0,52 |
| 19 | 0,45 | 0,41 | -0,05 |
| 20 | 0,4 | 0,53 | -0,4 |
| 21 | 0,62 | 0,52 | 0,15 |
| 22 | 0,56 | 0,58 | -0,1 |
| 23 | 0,54 | 0,54 | -0,05 |
| 24 | 0,6 | 0,63 | 0,11 |
| 25 | 0,3 | 0,72 | 1 |
| 26 | -0,15 | 0,81 | 0,08 |
| 27 | 0,59 | 0,54 | 0,32 |
| 28 | 0,64 | 0,53 | 0,23 |
| 29 | 0,94 | 0,49 | 0,2 |
| 30 | 0,56 | 0,6 | 0,11 |
| 31 | 0,74 | 0,38 | 0,08 |

Gladek J.: Določanje 8-hidroksidegvanozina v urinu pri otrocih glede na to, ali živijo v mestnem, kmečkem ali z živim srebrom obremenjenem okolju

| | | | |
|----|------|-------|--|
| 32 | 0,46 | 0,65 | |
| 33 | 0,2 | -0,15 | |
| 34 | 0,85 | 0,18 | |
| 35 | 0,08 | -0,15 | |
| 36 | 0,67 | 0,4 | |
| 37 | 0,43 | -0,4 | |
| 38 | 0,57 | 0,3 | |
| 39 | 0,56 | 0,56 | |
| 40 | 0,66 | 0,04 | |
| 41 | 0,48 | -0,15 | |
| 42 | 0,51 | -0,7 | |
| 43 | 1,02 | 0,04 | |
| 44 | 0,48 | 0,2 | |
| 45 | 0,75 | -0,3 | |
| 46 | 0,51 | -0,15 | |
| 47 | 0,6 | -0,1 | |
| 48 | 0,2 | 0,26 | |
| 49 | 1 | -0,3 | |
| 50 | 0,23 | -0,3 | |
| 51 | 0,65 | 0 | |
| 52 | 0,3 | 0,18 | |
| 53 | 0,57 | 0,49 | |
| 54 | 0,9 | -0,3 | |
| 55 | 0,18 | -0,22 | |
| 56 | 0,54 | -0,1 | |
| 57 | 0,18 | -0,52 | |
| 58 | 0,36 | 0,3 | |
| 59 | 0,32 | 0,6 | |
| 60 | 1,05 | -0,52 | |
| 61 | | 0,15 | |
| 62 | | 0,3 | |
| 63 | | -0,05 | |
| 64 | | -0,22 | |
| 65 | | 0,11 | |
| 66 | | -0,22 | |
| 67 | | 0,46 | |
| 68 | | 0,08 | |
| 69 | | 0,11 | |
| 70 | | -0,4 | |

Preglednica XXIV: Kolmogorov-Smirnov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu otrok OŠ Žužemberk

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 60 |
| povprečna vrednost | 4,282 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,650 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,009 |

Kraj = OŠ Žužemberk

Preglednica XXV: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu dečkov OŠ Žužemberk

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 34 |
| povprečna vrednost | 3,947 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,501 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,022 |

Kraj = OŠ Žužemberk, Spol = moški

Preglednica XXVI: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu deklic OŠ Žužemberk

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovank | 26 |
| povprečna vrednost | 4,719 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,992 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,279 |

Kraj = OŠ Žužemberk, Spol = ženski

Preglednica XXVII: Kolmogorov-Smirnov test za nelogaritimrane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu otrok OŠ Idrija

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 70 |
| povprečna vrednost | 2,457 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,952 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,325 |

Kraj= OŠ Idrija,

Preglednica XXVIII: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritimrane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu dečkov OŠ Idrija

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 36 |
| povprečna vrednost | 2,594 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,742 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,640 |

Kraj = OŠ Idrija, Spol = moški

Preglednica XXIX: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritimrane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu deklic OŠ Idrija

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovank | 34 |
| povprečna vrednost | 2,312 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | ,721 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,676 |

Kraj = OŠ Idrija, Spol = ženski

Preglednica XXX: Kolmogorov-Smirnov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu otrok OŠ Vižmarje Brod

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število oreiskovancev | 31 |
| povprečna vrednost | 2,994 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,453 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,029 |

Kraj = OŠ Vižmarje Brod

Preglednica XXXI: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu dečkov OŠ Vižmarje Brod

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovancev | 13 |
| povprečna vrednost | 2,115 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,130 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,155 |

Kraj = OŠ Vižmarje Brod, Spol = moški

Preglednica XXXII: Kolmogorov-Smirov test za nelogaritmirane vrednosti koncentracije 8-OH-dG v urinu deklic OŠ Vižmarje Brod

| | Koncentracija 8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ kreatinina) |
|-------------------------------|---|
| število preiskovank | 18 |
| povprečna vrednost | 3,628 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | 1,110 |
| p-vrednost (dvostranski test) | ,170 |

Kraj = Vižmarje Brod, Spol = ženski