

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



BRIGITA PENDIČ (KURAJA)

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV IZBRANIH GENOV S
KONCENTRACIJO SVINČEVIH IONOV V KRV
SLOVENSKIH STEKLOBRUSCEV**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN THE SELECTED GENES
WITH LEAD IONS BLOOD CONCENTRATIONS IN SLOVENIAN
GLASSMAKERS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

“If we were to judge of the interest excited by any medical subject by the number of writings to which it has given birth, we could not but regard the poisoning by lead as the most important to be known of all those that have been treated of, up to the present time”.

- M.P. Orfila, 1817

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. doc. dr. Milana Skitka, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Odvzem vzorcev krvi je potekal v laboratoriju Zdravstvenega doma Rogaška Slatina, meritve koncentracij svinčevih ionov v krvi in analiza ostalih pokazateljev njegove toksičnosti pa so določili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. doc. dr. Milanu Skitku Milan Skitku, mag. farm., spec. med. biokem. za strokovno vodenje in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Za ves trud, usmerjanje pri laboratorijskem delu ter pomoč pri statističnem vrednotenju rezultatov se iskreno zahvaljujem somentorici asist. dr. Simoni Jurković Mlakar mag. farm. Posebno zahvalo za nesebično podporo skozi celoten študij namenjam mojima staršema in sestri Aniti, ki so mi vedno stali ob strani in me spodbujali. Zahvala tudi možu Mariu za razumevanje in vzpodbudne besede v času nastajanja diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. doc. dr. Milana Skitka, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm.

Brigita Pendić

Ljubljana, 2016

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	SVINEC IN NJEGOVI VIRI IZPOSTAVLJENOSTI V VSAKDANJEM ŽIVLJENJU	1
1.2	TOKSIKOKINETIKA SVINCA	1
1.3	TOKSIČNOST SVINCA	3
1.3.1	<i>Akutna toksičnost.....</i>	3
1.3.2	<i>Kronična toksičnost.....</i>	3
1.3.3	<i>Mehanizmi toksičnosti Pb²⁺ na molekularni ravni</i>	5
1.4	GENETSKI DEJAVNIKI VPLIVA NA TOKSIČNOST Pb ²⁺	5
1.5	DEHIDRATAZA Δ-AMINOLEVULINSKE KISLINE (ALAD)	6
1.5.1	<i>Fiziološka vloga ALAD.....</i>	6
1.5.2	<i>Polimorizem Lys59Asn v genu za ALAD.....</i>	8
1.6	SINTAZA DUŠIKOVEGA OKSIDA (NOS).....	9
1.6.1	<i>Endotelijska sintaza dušikovega oksida (eNOS)</i>	10
1.6.2	<i>Fiziološka vloga eNOS.....</i>	10
1.6.3	<i>Polimorfizem Asp298Glu v genu za eNOS.....</i>	11
1.7	S PRENOSOM PROTONOV SKLOPLJENI OLIGOPEPTIDNI PRENAŠALCI (POT).....	13
1.7.1	<i>Peptidni prenašalec 2 (PEPT2, SLC15A2).....</i>	13
1.7.2	<i>Fiziološka vloga PEPT2.....</i>	14
1.7.3	<i>Polimorfizma Leu350Phe in Arg509Lys v genu za PEPT2 (SLC15A2).....</i>	15
2	NAMEN DELA.....	17
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	PREISKOVANA SKUPINA STEKLOBRUSCEV	18
3.1.1	<i>Določanje koncentracije Pb²⁺ v polni krvi</i>	18
3.1.2	<i>Določanje biokemičnih kazalcev toksičnosti Pb²⁺</i>	19
3.2	IZOLACIJA DNA IN NJENO VREDNOTENJE	21
3.2.1	<i>Določanje koncentracije in čistosti izolirane raztopine DNA vzorca</i>	23
3.2.2	<i>Redčenje raztopine DNA vzorca.....</i>	23
3.2.3	<i>Reagenti in oprema.....</i>	23
3.3	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU.....	25
3.3.1	<i>Načini detekcije produktov s PCR v realnem času.....</i>	25
3.3.2	<i>Genotipizacija s TaqMan[®] sondami</i>	26
3.4	GENOTIPIZACIJA.....	27
3.4.1	<i>Pomnoževanje zaporedja tarčne DNA.....</i>	27
3.4.2	<i>Reagenti in oprema.....</i>	31

3.5	STATISTIČNA ANALIZA	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33
4.1	IZOLACIJA DNA IN NJENO VREDNOTENJE	33
4.2	OPTIMIZACIJA POGOJEV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	33
4.3	RAZPRŠENI PRIKAZ REZULTATOV GENOTIPIZACIJE ZA IZBRANE POLIMORFIZME	34
4.4	GENOTIPSKE FREKVENCE IN POGOSTNOST IZBRANIH POLIMORFIZMOV	39
4.5	OCENA KLINIČNEGA POMENA IZBRANIH POLIMORFIZMOV V POVEZAVI Z DOLGOTRAJNO IZPOSTAVLJENOSTJO DELAVCEV TOKSIČNIM VPLIVOM Pb^{2+}	40
4.5.1	<i>Vpliv polimorfizma Lys59Asn gena ALAD na koncentracijo in ostale biokemične pokazatelje toksičnosti Pb^{+} v krvi delavcev.....</i>	42
4.5.2	<i>Vpliv polimorfizma Asp298Glu gena eNOS na koncentracijo in ostale pokazatelje toksičnosti Pb^{+} v krvi delavcev.....</i>	51
4.5.3	<i>Vpliv polimorfizmov Leu350Phe in Arg509Lys gena PEPT2 na koncentracijo in ostale pokazatelje toksičnosti Pb^{+} v krvi delavcev</i>	56
4.5.4	<i>Vpliv kombinacije polimorfizmov Leu350Phe in Arg509Lys gena PEPT2 na koncentracijo in ostale pokazatelje toksičnosti Pb^{+} v krvi delavcev</i>	65
5	SKLEP.....	68
6	LITERATURA	71
7	PRILOGE.....	I
7.1	PRILOGA 1: REZULTATI IZOLACIJE DNA VZORCEV PREISKOVANCEV	I
7.2	PRILOGA 2: REZULTATI GENOTIPIZACIJE	II
7.3	PRILOGA 3: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE.....	V
7.3.1	<i>Klinične značilnosti in povprečne vrednosti spremenljivk preiskovancev.....</i>	<i>v</i>
7.3.2	<i>ALAD (rs1800435; Lys59Asn)</i>	<i>vi</i>
7.3.3	<i>eNOS (rs1799983; Asp298Glu).....</i>	<i>xi</i>
7.3.4	<i>PEP2_1 (rs2257212; Leu350Phe)</i>	<i>xii</i>
7.3.5	<i>PEPT2_2 (rs1143672; Arg509Lys).....</i>	<i>xiv</i>

POVZETEK

POVEZANOST POLIMORFIZMOV IZBRANIH GENOV S KONCENTRACIJO SVINČEVIH IONOV V KRVI SLOVENSКИH STEKLOBRUSCEV

Dolgotrajen vnos svinca v telo v količinah, ki sicer ne presegajo dovoljenih vrednosti, predstavlja veliko tveganje za zdravje ljudi in je velik problem sodobne družbe, tako v poklicnem, kot v bivalnem okolju. Zanj je značilno počasno kopičenje v telesu skozi daljše časovno obdobje, kjer bodo določeni posamezniki kazali večjo dovzetni za njegovo toksičnost in škodljive učinke. Morebitne razlike v individualni občutljivosti bi lahko pripisali določenim genetskim dejavnikom, kot so polimorfizmi v genih za dehidratazo δ -aminolevulinske kisline (*ALAD*), endotelijsko NO sintazo (*eNOS*) ter peptidni prenašalec 2 (*PEPT2*).

V okviru diplomskega dela je bil zato namen določiti morebitno povezanost polimorfizmov Lys59Asn v *ALAD*, Asp298Glu v *eNOS* ter polimorfizmov Leu350Phe in Arg509 v *PEPT2* (*SLC15A2*) s koncentracijami Pb^{2+} v krvi populacije slovenskih steklobruscev Steklarne Rogaška d.d., katerih izpostavljenost smo spremljali od leta 2006 do 2009 ter preko biokemičnih kazalcev njihovega toksičnega delovanja ugotoviti posledice izpostavljenosti. Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (TaqMan® sonda) smo najprej pomnožili in genotipizirali tarčne odseke DNA 112 vzorcev krvi delavcev, od tega 80 žensk in 32 moških, nato pa s pomočjo statističnega programa SPSS, verzija 17.0. določili pogostnost ter ocenili klinični pomen izbranih polimorfizmov v povezavi z dolgotrajno izpostavljenostjo preučevane populacije toksičnim vplivom Pb^{2+} . Dobljene frekvence genotipov za vse štiri polimorfizme so se nahajale v Hardy-Weinbergovem ravnotežju in so bile naslednje: GG (79,4%) CG (17,0%), CC (3,6%) za polimorfizem Lys59Asn, GG (45,6%), GT (46,4%), TT (8,0%) za polimorfizem Asp298Glu ter CC (30,4%), CT (48,2%), TT (21,4%) in GG (32,1%), AG (44,6%), AA (23,2%) za polimorfizma Leu350Phe in Arg509Lys. Ugotovili smo statistično značilno povezanost polimorfizma Lys59Asn s povprečnimi vrednostmi koncentracij Pb^{2+} v krvi za leto 2006 (cPb_{2006} ; $p_{ANOVA}=0,003$), skupino združenih genotipov CG+CC ($p_{ANOVA}=0,006$) ter hitrostjo 4 -letnega upada koncentracije Pb^{2+} v krvi med letoma 2006 in 2009 ($dPb_{2006-2009}$; $p_{ANOVA}=0,011$). Za isti polimorfizem smo ugotovili (mejno) statistično značilno povezanost s povprečnimi vrednostmi aktivnosti encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline za leti 2006 (*ALAD*_2006; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,051$) in 2008 (*lnALAD*_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,080$) ter vrednostmi hemoglobina (*Hb*_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,045$). Polimorfizem Asp298Glu je prav tako kazal (mejno) statistično značilno povezanost s povprečnimi vrednostmi koncentracij Pb^{2+} v krvi (*ln**cPb*_2008; $p_{ANOVA}=0,051$ in *cPb*_2009; $p_{ANOVA}=0,070$), skupino združenih genotipov GT+TT (*ln**cPb*_2008; $p_{ANOVA}=0,050$ in *cPb*_2009; $p_{ANOVA}=0,040$), vrednostmi cistatina C_2008 ($p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,063$) ter aktivnostjo encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline (*ALAD*_2006; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,079$ in *ALAD*_2009; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,088$). (Mejno) statistično značilno povezanost s povprečnimi vrednostmi koncentracij Pb^{2+} v krvi (*ln**cPb*_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,063$ in *cPb*_2009; $p_{ANOVA}=0,081$), vrednostmi *Hb*_2008 ($p_{ANOVA}=0,099$) in aktivnostjo serumske gama-glutamyltransferaze (*lnGGT*; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,051$) smo določili tako za polimorfizem Leu350Phe, kot za polimorfizem Arg509Lys istega gena (*ln**cPb*_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,053$, *cPb*_2009; $p_{ANOVA}=0,046$, *Hb*_2008; $p_{ANOVA}=0,006$ ter *lnGGT*; $p_{ANOVA}=0,041$). Prav tako se je pokazala (mejno) statistično značilna povezanost

polimorfizma Arg509Lys s povprečnimi vrednostmi aktivnosti serumske alanin-aminotransferaze (lnALT; $p_{ANOVA}=0,032$) ter encimsko aktivnostjo ALAD_2006 in ALAD_2009. Kombinacija posameznih genotipov analiziranih polimorfizmov Leu350Phe in Arg509Lys je pokazala statistično značilno povezanost z aktivnostjo encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline (ALAD_2009; $p_{ANOVA}=0,010$), kjer so najnižjo aktivnost encima izkazovali posamezniki genotipa AG Arg509Lys genotipske podskupine CC Leu350Phe in najvišjo posamezniki istega genotipa Arg509Lys genotipske podskupine TT Leu350Phe.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da bi preučevani polimorfizmi lahko bili povezani s koncentracijo Pb^{2+} v krvi in posledično višjo genetsko občutljivostjo za njihovo toksičnost. Za trdnejše zaključke bi bilo potrebno rezultate testirati na večjem številu preiskovancev in tako povečati statistično moč naše analize. Vsekakor bi bilo smiselno preučiti tudi ostale genetske dejavnike v povezavi z izbranimi polimorfizmi, ki bi lahko preko uravnavanja absorpcije Ca^{2+} in Fe^{2+} prav tako vplivali na absorpcijo Pb^{2+} .

ABSTRACT

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN THE SELECTED GENES WITH LEAD IONS BLOOD CONCENTRATIONS IN SLOVENIAN GLASSMAKERS

Long - term domestic and occupational exposure to lead at levels which do not exceed the permissible levels remains a significant public health concern. Lead levels can build up slowly in the body over time, making individuals more susceptible to its toxicity. These differences in the susceptibility of individuals could be attributed to the polymorphisms in certain genes such as the ones for dehydratase δ -aminolevulinic acid (*ALAD*), endothelial NO synthase (*eNOS*) and peptide transporter 2 (*PEPT2*).

The aim within the scope of our diploma work was therefore to estimate the association between Lys59Asn *ALAD* gene polymorphism, Asp298Glu *eNOS* gene polymorphism and Leu350Phe and Arg509 *PEPT2* (*SLC15A2*) gene polymorphisms with Pb^{2+} ions blood concentrations, obtained in 2006-2009 from the population of Slovenian glassmakers, working at Steklarna Rogaška d.d. Biochemical markers of lead exposure effects for toxicity have been also determined. Initially target DNA sequences of 112 blood samples, 80 women and 32 men, were multiplied and genotyped using the method of real time polymerase chain reaction with specific TaqMan® probes. Using statistical analysis for SPSS, version 17.0, the prevalence and clinical importance of selected polymorphisms in association with long - term Pb^{2+} exposure were estimated. The resulting genotype frequencies for all four polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium and were found as follows: GG genotype (79.4%), CG (17.0%), CC (3.6%) for Lys59Asn polymorphism, GG genotype (45.6%), GT (46.4%), TT (8.0%) for Asp298Glu polymorphism and CC genotype (30.4%), CT (48.2%), TT (21.4%) and GG genotype (32, 1%), AG (44.6%), AA (23.2%) for Leu350Phe and Arg509Lys polymorphisms. We found a statistically significant association between Lys59Asn polymorphism and blood Pb^{2+} concentrations in 2006 (cPb_2006; $p_{ANOVA}=0,003$) for each genotype alone and between the combination of CG+CC genotypes ($p_{ANOVA}=0,006$). In addition, a statistically significant decline in blood Pb^{2+} levels between 2006 and 2009 (dPb 2006_2009; $p_{ANOVA}=0,011$) and marginally significant association between dehydratase δ -aminolevulinic acid enzymatic activity (ALAD_2006; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,051$, lnALAD_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,080$) and haemoglobin values (Hb_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,045$) has been found. Asp298Glu polymorphism showed (marginally) statistically significant association with blood Pb^{2+} concentrations as well (lnPb_2008; $p_{ANOVA}=0,051$ and cPb_2009; $p_{ANOVA}=0,070$), combination of GT+TT genotypes (lnPb_2008; $p_{ANOVA}=0,050$ and cPb_2009; $p_{ANOVA}=0,040$), cystatin C_2008 values ($p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,063$) and dehydratase δ -aminolevulinic acid activity (ALAD_2006; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,079$ and ALAD_2009; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,088$). Furthermore, Leu350Phe polymorphism has been (marginally) statistically significant related to blood Pb^{2+} concentrations (lnPb_2008; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,063$ and cPb_2009; $p_{ANOVA}=0,081$), Hb_2008 values ($p_{ANOVA}=0,099$) and serum gamma-glutamyltransferase activity (lnGGT; $p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,051$). The (marginally) statistical significance was also observed between Arg509Lys polymorphism and lnPb_2008 ($p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,053$), cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,046$), Hb_2008 ($p_{ANOVA}=0,006$), lnGGT ($p_{ANOVA}=0,041$), serum alanine aminotransferase activity (lnALT; $p_{ANOVA}=0,032$) and ALAD_2006 and ALAD_2009 activity. The association between ALAD_2009 activity ($p_{ANOVA}=0,010$) and combination of both analysed polymorphisms Leu350Phe and

Arg509Lys was discovered to be significant as well, whereas the lowest enzyme activity was determined among individuals with the AG genotype for the Arg509Lys polymorphism in the CC genotype subtype for Leu350Phe polymorphism and the highest among those with the same genotype for the Arg509Lys polymorphism in the TT genotype subtype for the Leu350Phe polymorphism.

Based on our results we can conclude that studied polymorphisms may be associated with Pb^{2+} blood concentrations and consequently a higher genetic susceptibility to lead toxicity. In order to increase the statistical power of our analysis we should include a larger number of subjects in future studies. It would be also reasonable to consider some other genetic factors in association with selected polymorphisms that could also affect the absorption of Pb^{2+} through the regulation of Ca^{2+} and Fe^{2+} absorption.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALAD	dehidrataza delta-aminolevulinske kisline
ALAS	sintaza delta-aminolevulinske kisline
ALT	alanin -aminotransferaza
ALA	delta-aminolevulinska kislina
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
BAL	dimerkaprol
BH ₄	5,6,7,8-tetrahidrobioplerin
CaM	kalmodulin
CDC	ameriški center za nadzor bolezni (<i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
Ct	cikel fluorescenčnega praga (pražna fluorescence) (<i>Cycle threshold</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DMSA	2,3-dimerkaptosukcinilna kislina
EDRF	endotelijski sproščujoči faktor
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EP	eritrocitni protoporfirin
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
FRET	fluorescenčni resonančni prenos energije (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
GABA	γ -aminobutirna kislina
tGC	topna gvanilat ciklaza
GFAAS	elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GGT	gama-glutamilna transferaza
Glu	glutaminska kislina
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
GSH	glutation
Lys	lizin

NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMDA	N-metil-D-aspartat
NOHA	N ω -hidroksi-L-arginin
NO _x	nitrit in nitrat
eNOS	endotelijska NO sintaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEPT2	peptidni prenašalec 2
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove spojine (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SOD	superoksid dismutaza
ZPP	cinkov protoporfirin
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (<i>World Health Organization</i>)

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: VOLUMNI REAGENTOV ZA IZOLACIJO DNA IZ 3 ML VZORCA PERIFERNE VENSKE KRVÍ.....	21
PREGLEDNICA II: PODATKI UPORABLJENIH TAQMAN® SOND ZA GENOTIPIZACIJO.	28
PREGLEDNICA III: SESTAVA REAKCIJSKE ZMESI ZA REAKCIJO POMNOŽEVANJA VZORČNE DNA POLIMORFIZMOV LYS59ASN GENA ALAD IN ASP298GLU GENA ENOS.	29
PREGLEDNICA IV: SESTAVA REAKCIJSKE ZMESI ZA REAKCIJO POMNOŽEVANJA VZORČNE DNA POLIMORFIZMOV LEU350PHE IN ARG509LYS GENA PEPT2.....	29
PREGLEDNICA V: TEMPERATURNNA SHEMA PCR REAKCIJE V REALNEM ČASU ZA POLIMORFIZMA LYS59ASN GENA ALAD IN ASP298GLU GENA ENOS.	30
PREGLEDNICA VI: TEMPERATURNNA SHEMA PCR REAKCIJE V REALNEM ČASU ZA POLIMORFIZMA LEU350PHE IN ARG509LYS GENA PEPT2.....	30
PREGLEDNICA VII: TEMPERATURNNA SHEMA PCR REAKCIJE V REALNEM ČASU ZA POLIMORFIZMA LEU350PHE IN ARG509LYS GENA PEPT2 PO OPTIMIZACIJI.....	34
PREGLEDNICA VIII: ŠTEVILO IN FREKVENCE (%) GENOTIPOV POLIMORFIZMOV LYS59ASN V ALAD, ASP298GLU V ENOS TER LEU350PHE IN ARG509LYS V PEPT2 PRI SLOVENSKIH STEKLOBRUSCIH.	40
PREGLEDNICA IX: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST ± SD) KONCENTRACIJE Pb ²⁺ V KRVÍ DELAVCEV (MG/L) PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA ALAD, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	43
PREGLEDNICA X: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST ± SD) POKAZATELJEV TOKSIČNOSTI Pb ²⁺ V KRVÍ DELAVCEV PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA ALAD, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	46
PREGLEDNICA XI: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST ± SD) KONCENTRACIJE Pb ²⁺ V KRVÍ DELAVCEV (MG/L) PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA ENOS, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	51
PREGLEDNICA XII: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST ± SD) POKAZATELJEV TOKSIČNOSTI Pb ⁺ V KRVÍ DELAVCEV PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA ENOS, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	54
PREGLEDNICA XIII: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST ± SD) KONCENTRACIJE Pb ²⁺ V KRVÍ DELAVCEV (MG/L) PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP	

POLIMORFIZMA GENA PEPT2, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	56
PREGLEDNICA XIV: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE Pb ²⁺ V KRVNI DELAVCEV (MG/L) PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA PEPT2, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	58
PREGLEDNICA XV: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) POKAZATEJEV TOKSIČNOSTI Pb ²⁺ V KRVNI DELAVCEV PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA PEPT2, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	60
PREGLEDNICA XVI: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) POKAZATELJEV TOKSIČNOSTI Pb ²⁺ V KRVNI DELAVCEV PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA GENOTIP POLIMORFIZMA GENA PEPT2, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV ANOVA TER LSD POST HOC TESTOV.....	61
PREGLEDNICA XVII: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE KONCENTRACIJ Pb ²⁺ V KRVNI DELAVCEV (MG/L) PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA KOMBINACIJO POLIMORFIZMOV GENA PEPT2, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV TESTA DVOSMERNE ANOVA.....	65
PREGLEDNICA XVIII: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE POKAZATELJEV TOKSIČNOSTI Pb ²⁺ V KRVNI DELAVCEV PO POSAMEZNIH LETIH IZPOSTAVLJENOSTI GLEDE NA KOMBINACIJO POLIMORFIZMOV GENA PEPT2, V OKVIRU STATISTIČNE ANALIZE REZULTATOV TESTA DVOSMERNE ANOVA.....	66
PREGLEDNICA XIX: IZMERJENE KONCENTRACIJE VZORCEV IZOLIRANE DNA PRI VALOVNI DOLŽINI 260 NM.....	I
PREGLEDNICA XX: GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV LYS59ASN GENA ALAD, ASP298GLU GENA ENOS TER LEU350PHE IN ARG509LYS GENA PEPT2 PREISKOVANCEV.....	II
PREGLEDNICA XXI: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK PREISKOVANCEV.....	V
PREGLEDNICA XXII: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA ANOVA.....	VI
PREGLEDNICA XXIII: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA KRUSKAL-WALLIS.....	VII
PREGLEDNICA XXIV: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE SPREMENLJIVK PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU POST HOC TESTOV (SCHEFFE, LSD, BONFERRONI).....	VIII

PREGLEDNICA XXV: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA ANOVA.....	XI
PREGLEDNICA XXVI: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA KRUSKAL-WALLIS.....	XII
PREGLEDNICA XXVII: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE SPREMENLJIVK PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU POST HOC TESTOV (SCHEFFE, LSD, BONFERRONI).....	XII
PREGLEDNICA XXVIII: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA ANOVA.....	XII
PREGLEDNICA XXIX: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA KRUSKAL-WALLIS.....	XIII
PREGLEDNICA XXX: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE SPREMENLJIVK PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU POST HOC TESTOV (SCHEFFE, LSD, BONFERRONI).....	XIV
PREGLEDNICA XXXI: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA ANOVA.....	XIV
PREGLEDNICA XXXII: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) SPREMENLJIVK IN REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA KRUSKAL-WALLIS.....	XV
PREGLEDNICA XXXIII: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE SPREMENLJIVK PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU POST HOC TESTOV (SCHEFFE, LSD, BONFERRONI).....	XV
PREGLEDNICA XXXIV: REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE SPREMENLJIVK PREISKOVANE SKUPINE DELAVCEV V OKVIRU TESTA ANCOVA.....	XVI

KAZALO SLIK

SLIKA 1: BIOSINTEZNA POT HEMA. Δ -ALA - Δ -AMINOLEVULINSKA KISLINA, CoA - KOENCIM A, PBG - PORFOBILINOGEN, A= -CH ₂ COOH, M = -CH ₂ , P = -CH ₂ CH ₂ COOH, V = -CH=CH....	7
SLIKA 2: SHEMATSKI PRIKAZ POTEKA REAKCIJE PCR V REALNEM ČASU S TAQMAN [®] SONDO.....	26
SLIKA 3: PRIKAZ UPORABLJENIH STATISTIČNIH TESTOV PRI STOPNJI ZNAČILNOSTI A=0,05.....	32
SLIKA 4: KRIVULJI FLUORESCENCE BARVILA VIC [®] PRI VALOVNI DOLŽINI 535-580 NM.....	35
SLIKA 5: KRIVULJI FLUORESCENCE BARVILA FAM [®] PRI VALOVNI DOLŽINI 465-510 NM.....	35
SLIKA 6: KRIVULJI FLUORESCENCE OBEH BARVIL PRI VALOVNI DOLŽINI 535-580NM IN 465-510 NM ZA HETEROZIGOTEN VZOREC GENA ALAD (Lys59Asn; rs1800305)	36
SLIKA 7: KRIVULJE FLUORESCENCE POMNOŽEVANJA VSEH VZORCEV GENA ALAD (Lys59Asn; rs1800305).....	37
SLIKA 8: RAZPRŠENI PRIKAZ REZULTATOV KONČNE GENOTIPIZACIJE GENA ALAD (Lys59Asn; rs1800305). ZELENA VIC [®] - GENOTIP GG, MODRA FAM [®] - GENOTIP CC, RDEČA - GENOTIP CG, ROZA - NEOPREDELJEN GENOTIP, SIVA - NEUSPELI IN VZOREC NEGATIVNE KONTROLE. .	37
SLIKA 9: RAZPRŠENI PRIKAZ REZULTATOV KONČNE GENOTIPIZACIJE GENA eNOS (Asp298Glu; rs1799983). ZELENA VIC [®] - GENOTIP GG, MODRA FAM [®] - GENOTIP TT, RDEČA - GENOTIP GT, ROZA - NEOPREDELJEN GENOTIP, SIVA - NEUSPELI IN VZOREC NEGATIVNE KONTROLE..	38
SLIKA 10: RAZPRŠENI PRIKAZ REZULTATOV KONČNE GENOTIPIZACIJE GENA PEPT2 (Leu350Phe;rs2257212). ZELENA VIC [®] - GENOTIP CC, MODRA FAM [®] - GENOTIP TT, RDEČA - GENOTIP CT, ROZA - NEOPREDELJEN GENOTIP, SIVA - NEUSPELI IN VZOREC NEGATIVNE KONTROLE.....	38

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE CPB_2006 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT).....	44
GRAF 2: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) PADCA KONCENTRACIJE PB ²⁺ V OBDOBJU IZPOSTAVLJENOSTI 2006 - 2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT).	45
GRAF 3: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI ALAD_2006 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT).....	47
GRAF 4: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI LNALAD_2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT).....	47
GRAF 5: REZULTATI KORELACIJE KONCENTRACIJ CPB_2006 IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI ALAD_2006.....	48
GRAF 6: REZULTATI KORELACIJE KONCENTRACIJ LNCPB_2008 IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI LNALAD_2008.....	49
GRAF 7: REZULTATI KORELACIJE KONCENTRACIJ CPB_2009 IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI ALAD_2009.....	49
GRAF 8: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE HB_2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT)....	50
GRAF 9: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE LNCPB_2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ASP298GLU (ENOS), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, TT - MUTIRAN HOMOZIGOT, GT - HETEROZIGOT).	52
GRAF 10: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE CPB_2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ASP298GLU (ENOS), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, TT - MUTIRAN HOMOZIGOT, GT - HETEROZIGOT).	52
GRAF 11: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI ALAD_2006 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ASP298GLU (ENOS), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, TT - MUTIRAN HOMOZIGOT, GT - HETEROZIGOT).....	55

GRAF 12: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI ALAD_2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ASP298GLU (eNOS), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, TT - MUTIRAN HOMOZIGOT, GT - HETEROZIGOT).....	55
GRAF 13: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE LNCpB_2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LEU350PHE (PEPT2_1), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (CC - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, TT - MUTIRAN HOMOZIGOT, CT - HETEROZIGOT).....	57
GRAF 14: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE cPB_2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LEU350PHE (PEPT2_1), V OKVIRU TESTA ANOVA (CC - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, TT - MUTIRAN HOMOZIGOT, CT - HETEROZIGOT). 58	
GRAF 15: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE LNCpB_2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).	59
GRAF 16: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE cPB_2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).	59
GRAF 17: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI ALAD_2006 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG -NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).	62
GRAF 18: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI ALAD_2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU LSD POST HOC TESTA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).	62
GRAF 19: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE Hb_2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).	63
GRAF 20: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI LNALT GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).....	64

GRAF 21: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI L ^N GGT GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, AA - MUTIRAN HOMOZIGOT, AG - HETEROZIGOT).....	64
GRAF 22: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KATALITIČNE AKTIVNOSTI ALAD_2006 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE KOMBINACIJ POLIMORFIZMA LEU50PHE (PEPT2_1) IN ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU DVOSMERNEGA TESTA ANOVA.....	67
GRAF 23: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE CPB_2006 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE KOMBINACIJ POLIMORFIZMA LEU50PHE (PEPT2_1) IN ARG509LYS (PEPT2_2), V OKVIRU DVOSMERNEGA TESTA ANOVA.....	67
GRAF 24: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE CPB_2006 GLEDE NA GENOTIPSKI PODSKUPINI GG IN CG+CC POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU NEODVISNEGA T-TESTA (T*).....	VIII
GRAF 25: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE LNC _{PB} _2008 GLEDE NA GENOTIPSKI PODSKUPINI GG IN GT+TT POLIMORFIZMA ASP298GLU (ENOS), V OKVIRU NEODVISNEGA T-TESTA (T*).	IX
GRAF 26: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE CPB_2009 GLEDE NA GENOTIPSKI PODSKUPINI GG IN GT+TT POLIMORFIZMA ASP298GLU (ENOS), V OKVIRU NEODVISNEGA T-TESTA (T*).....	IX
GRAF 27: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE LNC _{PB} _2008 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT). X	
GRAF 28: POVPREČNE VREDNOSTI (SREDNJA VREDNOST $\pm$ SD) KONCENTRACIJE CPB_2009 GLEDE NA GENOTIPSKE PODSKUPINE POLIMORFIZMA LYS59ASN (ALAD), V OKVIRU TESTA ANOVA (GG - NEMUTIRAN HOMOZIGOT, CC - MUTIRAN HOMOZIGOT, CG - HETEROZIGOT).....	X

1 UVOD

1.1 Svinec in njegovi viri izpostavljenosti v vsakdanjem življenju

Svinec je mehka, modrikasto bele barve visoko sijoča težka kovina, ki na zraku potemni v značilno sivo. Je izjemno odporen na korozijo. Naravno se nahaja v zemeljski skorji v obliki različnih mineralov, največkrat kot anorganski PbS - galenit, lahko pa tudi kot PbCO_3 - cerusit ali PbSO_4 - anglesit. Njegovi običajni oksidacijski stanji sta +2 in +4 (1, 2).

Danes se več kot polovica svinca (60-80%) porabi v avtomobilski industriji za svinčene baterije in akumulatorje, sledijo ji vojaška in računalniška industrija, kemična industrija, gradbeništvo ter jedrska tehnologija (3, 4, 5). V začetku 20. stoletja se je začel uporabljati tetraetil svinec kot dodatek bencinu za povečanje oktanskega števila proti t.i. klenkanju motorja, ki so ga zaradi njegove nevrotoksičnosti in škodljivega vpliva na okolje v večini držav prenehali proizvajati že sredi 70-ih let. Prav tako je bila z zakonom prepovedana uporaba barv na osnovi svinca (svinčev oksid, karbonat), kjer so predvsem nevarni delci strupenega svinčenega prahu, ki nastajajo pri odstranjevanju starih opleskov (1, 3). Svinčevi oksidi, ki prispevajo k boljšim optičnim lastnostim kristala, se v industriji stekla in keramike ponekod še vedno uporabljajo za izdelavo okrasnih predmetov iz svinčenega brušenega stekla, kot so kristalni kozarci, vaze in vrčki. Pri temperaturno neustrezno obdelanem steklu obstaja velika nevarnost izločanja slabo vezanega svinca v živila, zlasti v primeru kisle hrane ali pijače, ko je ta proces še dodatno pospešen (vino, jabolčni sok) (2).

1.2 Toksikokinetika svinca

Da bi bolje razumeli možne škodljive učinke svinca na zdravje ljudi, je potrebno poznati njegovo toksikokinetiko, ki pa je precej zapletena in odvisna od številnih faktorjev. Nanjo v veliki meri vplivajo fizikalno kemijske lastnosti svinca (organska ali anorganska oblika), starost, fiziologija, prehrabene navade, način življenja (kajenje in uživanje alkohola), stopnja izpostavljenosti ter genetske značilnosti posameznika (6). Vnos svinca v telo poteka največkrat preko hrane, pitne vode, zraka in zemlje, možen pa je tudi prenos z matere na plod preko posteljice ali mleka (7, 8). Pomemben vir njegovega vnosa predstavljajo tudi alkoholne pijače, zlasti vina, nekoliko manj tobačni izdelki (9). Anorganski svinec običajno vstopa v telo preko prebavil in dihal, redkeje preko kože (10, 11).

Absorpcija vdihanega svineca (približno 90%) je omejena predvsem z velikostjo delcev in njihovo topnostjo, kjer manjši delci ($<1\ \mu\text{m}$) prodrejo globlje v respiratorni trakt in se lažje absorbirajo v kri (7, 12). Na stopnjo absorpcije svineca iz gastrointestinalnega trakta, ki navadno poteka s pasivno difuzijo ali z dvovalentnim transporterjem DMT1 (angl. *Divalent Metal Transporter 1*), vpliva več dejavnikov. Najpomembnejša med njimi sta starost in prehranjenost organizma (13). S starostjo se ta stopnja znižuje in je pri odraslih precej nizka (5-15%), za razliko od otrok, kjer je delež absorbiranega svineca po zaužitju lahko tudi do 40% in več. Ti so zaradi presnovnih značilnosti organizma, hitrejši in bolj učinkoviti absorpcije ter večjega vnosa hranil na enoto telesne teže, izredno občutljiva skupina (6). Izbrana prehrana, bogata z vitaminom C, E, kalcijem, železom, cinkom in selenom, prav tako upočasni njegovo absorpcijo, ki je bistveno večja na prazen želodec (40-60%), kot pa v primeru redne prehrane, ko je le-ta 10% (14, 15). Po vstopu v krvni obtok se 5-10% zaužitega svineca nahaja v krvi, od tega ga je približno 95% naloženega v eritrocitih, manjši delež (5%) pa ostaja v plazmi, vezan na beljakovine ali v prosti ionski obliki. Preostanek se postopoma porazdeli med mehka (ledvica, jetra, možgani) in kalcificirana tkiva (kosti, zobovje). Znano je, da svinec v krvi odraža nedavno ali kratkotrajno izpostavljenost izpred nekaj tednov do nekaj mesecev, medtem ko je njegova vrednost v kosteh pokazatelj akumulirane količine svineca skozi desetletja in s tem izpostavljenosti skozi daljše časovno obdobje (9, 13). Absorbirani svinec se skoraj v celoti (70-90%) vgradi v kristalno strukturo hidroksiapatita kosti, kjer s Ca^{2+} tekmuje za isti transportni sistem. V času kostne presnove lahko prihaja do povečane mobilizacije svineca iz intracelularnih zalog kosti v plazmo, kar naj bi bilo odvisno od genetskih, hormonskih, presnovnih in fizioloških faktorjev posameznika (16). Trabekularni del kostnine, ki velja za metabolično bolj aktivno področje kosti, naj bi tako predstavljal eno četrtno labilnega in hitro izmenjujočega se svineca v kosteh, medtem ko naj bi preostale tri četrtine bile naložene v kompaktnem kostnem matriksu in služile kot počasi sprušujoč vir svineca (10). Visok vnos kalcija in železa v telo ima podoben učinek, medtem ko vitamin D in fosfati spodbujajo odlaganje svineca v kosteh ter na ta način znižujejo njegovo koncentracijo v mehkih tkivih. Sproščanje svineca iz kosti je povečano tudi v času nosečnosti, dojenja, menopavze, ob večjih fizičnih naporih, kroničnih boleznih ter pri starejših osebah (17, 18). 75-80% vsega svineca se iz telesa izloča z urinom, približno 15% pa preko žolča z blatom. Svinec, ki se izloča z blatom, vključuje tudi svinec, ki se ni absorbiral preko GIT-a. Izločanje s slino, znojem, preko las in nohtov je majhno (11, 14), običajno manj kot 8%.

1.3 Toksičnost svınca

Zanj je značilno počasno kopičenje v telesu (bioakumulacija), zato dolgotrajen vnos svınca v organizem v količinah, ki sicer ne presegajo dovoljenih vrednosti, predstavlja veliko tveganje za zdravje ljudi (19). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organization* - WHO) je sprejemljiva tedenska vrednost vnosa svınca za odrasle 50 µg/kg telesne teže in za otroke 25 µg/kg telesne teže. Ameriški Center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. *Center for Disease and Prevention* - CDC) navaja kot mejno vrednost svınca v krvi, pri kateri je potrebno ukrepanje, 100 µg/L (6).

1.3.1 Akutna toksičnost

Z akutnimi zastrupitvami svınca se srečujemo redko. Črevesni krči so običajno prvi znak zastrupitve s spremljajočo slabostjo, bruhanjem, izgubo teka, zaprtjem ter hudimi abdominalnimi bolečinami (svinčeve kolike). Na dlesnih se pojavi sivomodrikast svinčev rob »Burtonova črta« (6). V hujših primerih prihaja do oligurije, cirkulatornega kolapsa in izgube zavesti. Akutna svinčeva encefalopatija nastopi pri vrednostih svınca med 80 in 300 µg/dL, v obliki disorientacije, glavobola, zmedenosti, zaspanosti ter končne kome (11, 12).

1.3.2 Kronična toksičnost

Kronična zastrupitev, kot posledica dolgotrajne izpostavljenosti svincu na delovnem mestu, se klinično največkrat in najbolj izrazito kaže na sledečih organskih sistemih (8, 9).

- *Hematopoetski sistem:* Svinec deluje toksično na hematopoetski sistem preko inhibicije aktivnosti vsaj treh encimov, ki sodelujejo pri sintezi hema. Izpostavljenost svincu že pri koncentraciji 40-50 µg/dL lahko izzove mikro- in normocitno anemijo, kar je posledica vpliva svınca na sintezo hema ali skrajšane življenjske dobe eritrocitov. Svinec namreč zavira encim pirimidin-5-nukleotidazo, ki povzroči agregacijo RNA in bazofilne vključke v eritrocitih (10, 20). Za inhibicijo hema sta najbolj dovzetna encima δ-aminolevulinska kislina dehidrataza (ALAD) in ferohelataza. Inhibicija ALAD, kot začetnega encima v sintezi, se kaže v zmanjšani produkciji hema pri vrednostih svınca med 10 in 20 µg/dL (21). Ker v tem primeru ni regulacije preko negativne povratne zanke, je aktivnost ALAS povečana. Kot glavni znak zastrupitve s svincem se pojavijo

anemije, v serumu in urinu pa se kopiči δ -aminolevulinska kislina (ALA), ki se uporablja kot diagnostični parameter. Povišane so koncentracije eritrocitnega protoporfirina v krvi, v urinu pa koproporfirina in uroporfirina (20, 21).

- *Nefrotoksičnost:* Ledvična okvara povzročena s svincem se najpogosteje kaže v obliki glomerulne skleroze, intersticijske fibroze, funkcijske okvare ter propada celic proksimalnih ledvičnih tubulov (11). Temu procesu običajno sledi značilna tvorba inkluzijskih protiteles v jedrih celic proksimalnih tubulov v obliki kompleksov svinec-protein, pogosta pa sta tudi zmerne hipertenzija in nastanek gihta (putike) (21).
- *Kardiovaskularni sistem:* Natančen mehanizem s svincem povzročene hipertenzije in možnega miokardnega infarkta še ni poznan. Predvidevajo, da z neposrednim delovanjem na gladkomišične celice žil, svinec vpliva na koncentracijo znotrajceličnega Ca^{2+} in s tem povezano vazokonstrikcijo. Preko povečane tvorbe reaktivnih kisikovih spojin (ROS) naj bi motil sintezo NO, ki zagotavlja ustrezno delovanje žilnega endotelija, vpleten pa naj bi tudi bil v aktivacijo renin-angiotenzinskega sistema in stimulacijo Na^+/K^+ črpalke (22, 23). Koncentracija svinca v krvi, ki povzroči porast krvnega tlaka, naj bi po podatkih JECFA, bila nad $30 \mu\text{g/dL}$ (11).
- *Nevrotoksičnost:* Toksičen vpliv svinca na živčni sistem se najpogosteje odraža v obliki svinčeve encefalopatije in periferne motorične nevropatije. Znano je, da svinec poveča občutljivost nevronov za ekscitotoksične poškodbe glutamata, ki imajo pomembno vlogo pri učenju in spominu, vpliva na sproščanje inhibitornega nevrottransmitterja GABA ter selektivno blokira N-metil-D-aspartat receptorje v hipokampusu, kjer podatki iz kratkotrajnega spomina prehajajo v dolgotrajnega (13). Periferna motorična nevropatija, za katero je značilna prizadetost perifernega živčevja z demielinizacijo živcev, zlasti okončin, se najpogosteje pojavlja pri odraslih. Prisotno je tipično padanje zapestja in stopala (wristdrop, footdrop), razvije pa se lahko tudi parestezija (zbadanje, mravljinčenje, otrplost) (21). V krvi delavcev, ki so delali s svincem, so odkrili tudi protitelesa za amiotropno lateralno sklerozo, bolezen osrednjega živčevja, ki se kaže z okvaro in progresivnim propadanjem motoričnih živčnih celic (24).
- *Reproduktivna toksičnost:* Znižanje intelektualne sposobnosti, kot posledica prehajanja svinca preko posteljice in krvnožilne bariere možganskega tkiva ter s tem nastanek biokemičnih in funkcijskih sprememb živčnega sistema pri plodu, je opaziti pri koncentracijah svinca v krvi matere nad $10 \mu\text{g/dL}$. Iste vrednosti lahko izzovejo splav, predčasni porod in so razlog za nizko porodno težo novorojenčka (11, 17).

1.3.3 *Mehanizmi toksičnosti Pb²⁺ na molekularni ravni*

Molekularno toksičnost svinca lahko povzamemo v naslednje kategorije (7, 13, 25, 26):

- vpliv na Ca²⁺ homeostazo,
- interakcije s komponentami celičnih membran (strukturnimi proteini), transportnimi sistemi (Na⁺/K⁺-ATPazo) in receptorji, lipidna peroksidacija celičnih membran,
- vpliv na encimske sisteme: zamenjava dvovalentnih kationov esencialnih kovin (Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺) vezavnih mest proteinov in drugih biološko pomembnih molekul s posledično spremembo njihove strukture in funkcije, tvorba kompleksnih vezi s prostimi (-SH) skupinami proteinov, inhibicija encimov biosintezne poti hema (dehidrataze δ -aminolevulinske kisline, koproporfirinogen oksidaze, ferokelataze) ter encimov superoksidne dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPX), glutation reduktaze (GR) in glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD),
- vpliv na signalne poti v celici (tvorba kisikovih - ROS in dušikovih - RNS reaktivnih spojin) in druge signalne poti v povezavi s procesom kancerogeneze (strukturne spremembe kromosomov, inhibicija aktivnosti DNA in RNA polimeraze),
- strukturne in funkcionalne spremembe v mitohondrijih (odklop oksidativne fosforilacije, motena dihalna veriga).

1.4 **Genetski dejavniki vpliva na toksičnost Pb²⁺**

V literaturi je čedalje več raziskav usmerjenih v preučevanje in razumevanje genetskih dejavnikov, ki bi lahko pojasnili morebitne razlike v individualni občutljivosti, odzivu ter povečani nagnjenosti posameznika povišanim koncentracijam določenih škodljivih snovi ali toksičnosti delovnega okolja (27, 28). V genetsko predispozicijo za Pb²⁺ naj bi bilo vključenih več različnih genov, najbolj raziskana je njihova povezava s polimorfizmi v genih za dehidratazo δ -aminolevulinske kisline (*ALAD*), endotelijsko NO sintazo (*eNOS*), peptidni prenašalec 2 (*PEPT2*), receptor vitamina D (*VDR*) ter dedno hemokromatozo (*HFE*). Mehanizem vpliva teh polimorfizmov na koncentracijo Pb²⁺ v krvi in/ali odzivnost na njihovo toksičnost še ni popolnoma znan, odvisen pa naj bi tudi bil od zunanjih dejavnikov, kot so spol, starost in način življenja posameznika, kjer naj bi alkoholne pijače, zlasti vina ter kajenje zviševala koncentracijo le-teh v krvi (28).

1.5 Dehidrataza δ -aminolevulinske kisline (ALAD)

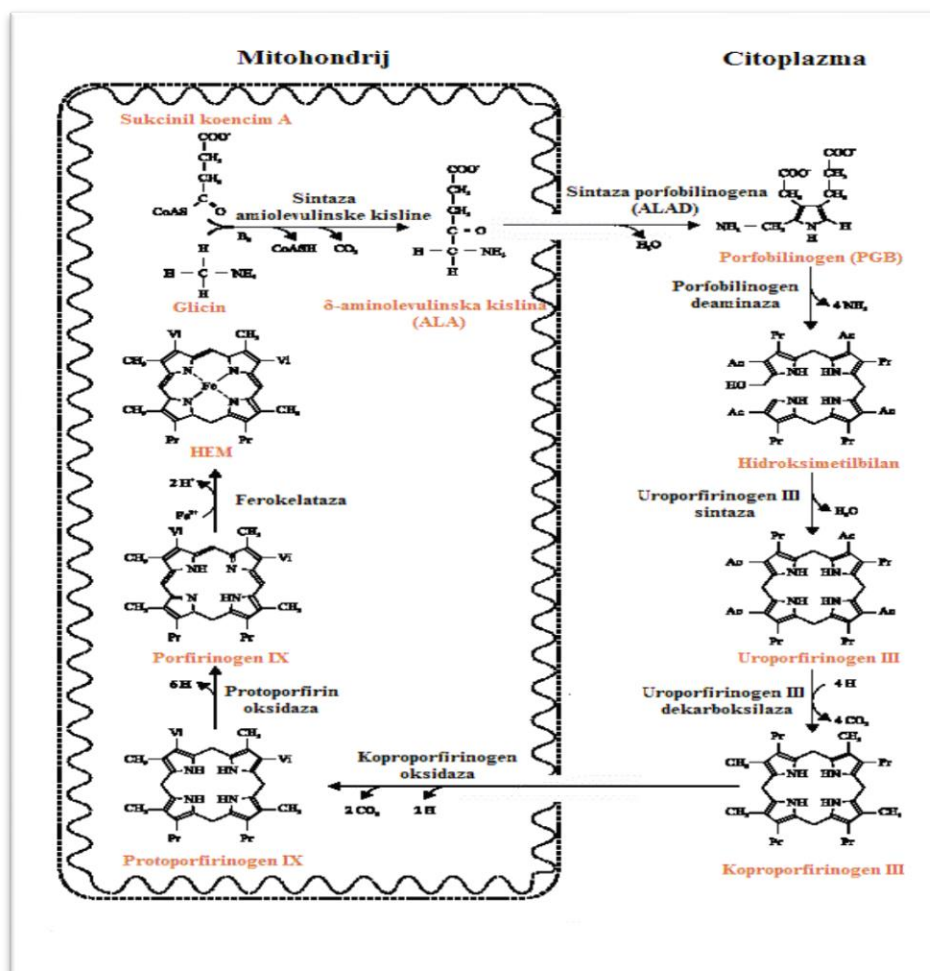
Dehidrataza δ -aminolevulinske kisline (ALAD; sintaza porfobilinogena; E.C. 4.2.1.24) je eden izmed ključnih encimov v biosintezni poti hema (28, 29, 30). Gre za homooktamer dihedralne simetrije (D_4) (31), sestavljen iz osmih identičnih Zn^{2+} vsebujočih podenot tipa $(\beta/\alpha)_8$, zvitih v strukturo TIM sodčka (triozefosfat izomeraza). Valjasto strukturo osmih paralelno urejenih β -trakov z osmimi α -vijačnicami povezujejo kratke zanke, usmerjene k zunanji površini oktamera, ki so organizirane tako, da tvorijo osem aktivnih mest na C-koncu β -strukture encima (32) ter skupino Cys, Lys in His aminokislinskih ostankov (33). Za katalitično aktivnost encima naj bi bili ključni le štirje Zn^{2+} , vsak v kompleksu z Cys^{122} , Cys^{124} ter Cys^{132} , medtem ko naj bi ostali štirje Zn^{2+} prispevali k stabilnosti in trdnosti oktamerne strukture proteina (30, 33). Vezava Pb^{2+} na -SH skupine cisteina povzroči konformacijsko spremembo kvarterne strukture proteina, kar onemogoči vezavo δ -ALA na ALAD in ima za posledico spremenjeno ali zmanjšano aktivnost encima. Koncentracija Pb^{2+} v krvi med 15 in 30 $\mu g/dl$ se kaže v 50-70% zmanjšani aktivnosti ALAD (34).

1.5.1 Fiziološka vloga ALAD

Dehidrataza δ -aminolevulinske kisline katalizira kondenzacijo dveh molov δ -aminolevulinske kisline (ALA) v porfobilinogen (PGB), ki je predhodnik hema, citokromov in ostalih hemoproteinov (31, 32, 34). Proces biosinteze hema se odvija bolj ali manj v vseh celicah, brez zrelih eritrocitov, ki nimajo mitohondrija. Od tega se ga večina sintetizira v eritroidnih celicah kostnega mozga in v jetrnih celicah hepatocitov (29).

Biosinteza hema je zaporedje biokemičnih reakcij, kjer sodeluje osem encimov. Prva stopnja se prične v mitohondrijih, kjer iz glicina in sukcinil koencima A v prisotnosti pirodoksalfosfata nastane δ -aminolevulinska kislina (ALA). Reakcijo katalizira encim sintaza aminolevulinske kisline (EC 2.3.1.36), ki je hkrati tudi bistvena regulatorna stopnja v biosintezi hema in s tem nastale δ -ALA. Slednja se iz mitohondrijskega matriksa premakne v citosol, kjer se pod vplivom sintaze porfobilinogena (EC 4.2.1.24) dve molekuli δ -ALA povežeta v porfobilinogen (PGB) (27, 28). Reakcija biosinteze hema se nadaljuje z združitvijo štirih molekul PGB v hidroksimetilbilan pod vplivom encima hidroksimetilbilan sintaze (EC 4.3.1.8), še pred tem pa poteče eliminacija štirih molekul NH_3 . Uroporfirinogen III sintaza (EC 4.2.1.7) katalizira pretvorbo (hidrolizacijo) hidroksimetilbilana v tetrapirolov obroč, uroporfirinogen III. Sledi več reakcij

dekarboksilacije in oksidacije do protoporfirinogena IX. Ob prisotnosti uroporfirinogen dekarboksilaze (EC 4.1.1.37), petega encima v biosintezi hema, se vsi acetilni substituenti na uroporfirinogenu III dekarboksilirajo do metilnih skupin. Nastane koproporfirinogen III, ki se iz citosola prenese na notranjo stran membrane mitohondrija. Tu koproporfirinogen oksidaza (EC 1.3.3.3) sodeluje pri oksidaciji propionatnih skupin do protoporfirinogena IX, kjer prav tako pod vplivom encima protoporfirinogen oksidaze (EC 1.3.3.4) poteče oksidacija protoporfirinogena do protoporfirina IX. Končni korak v biosintezi hema je vključevanje Fe^{2+} v molekulo protoporfirina IX, ki ga na notranji strani membrane mitohondrija katalizira ferokelataza (EC 4.99.1.1). Kovinski ioni z valenco $2+$, med njimi tudi Zn^{2+} , tekmujejo z Fe^{2+} za vezavo v protoporfirin IX, pri čemer nastaja cinkov protoporfirin (ZPP) (27).



Slika 1: Biosintezna pot hema. δ -ALA - δ -aminolevulininska kislina, CoA - koencim A, PBG - porfobilinogen, A = $-\text{CH}_2\text{COOH}$, M = $-\text{CH}_2$, P = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, V = $-\text{CH}=\text{CH}$ (prirejeno po 35)

1.5.2 Polimorizem *Lys59Asn* v genu za *ALAD*

Gen, ki nosi zapis za dehidratazo δ -aminolevulinske kisline (*ALAD*), leži na daljši ročici kromosoma 9 (območje 9q34) in je dolg približno 16 kB. Obsega 15.913 baznih parov (bp) in vsebuje 13 eksonov. V največji je meri izražen v eritrocitih in kostnem mozgu (29, 35).

Literatura navaja 8 polimorfizmov, ki so jih našli v genu za *ALAD*. Najpogostejše med njimi preučevan polimorfizem c.177G>C (*Lys59Asn*, rs1800435), ki vsebuje transverzijo nukleotida G v nukleotid C na mestu 177 v eksonu 4, povzroči zamenjavo lizina (Lys) z asparaginom (Asn) na mestu 59. To daje dva kodominantna alela *ALAD-1* (59Lys) in *ALAD-2* (59Asn), ki sta vpletena v patogenezo zastrupitve s svincem in ju povezujejo z različno odzivnostjo posameznika na njegovo toksičnost (35). Frekvenca polimorfizma se med populacijami razlikuje in je najbolj izrazita med belci (20%), nekoliko manj med Azijci (10%), medtem ko je pri Afroameričanih zelo redka ali pa je sploh ni (35, 36). Številne študije morebitne povezanosti polimorfizma *ALAD* z razlikami v koncentraciji Pb^{2+} v krvi in/ali višjo dovzetnostjo za njihovo toksičnost med posamezniki poročajo o nasprotujočih si rezultatih. Večina jih z višjimi vrednostmi in tveganjem za toksične učinke povezuje alel Asn, druge alel Lys, medtem ko pa tretje te povezave med posameznimi genotipi niso potrdile (28, 35). V študiji na nemških delavcih (N=202) in otrocih (N=1278) so pri nosilcih alela Asn opisali za 9-11 $\mu\text{g/dL}$ značilno višje koncentracije Pb^{2+} v krvi v primerjavi s posamezniki, ki tega alela niso imeli. Tudi manjša raziskava na poklicno izpostavljenih delavcih je te ugotovitve potrdila, kjer so homozigoti Asn/Asn zopet izkazovali najvišje (56 $\mu\text{g/dL}$) in homozigoti Lys/Lys najnižje (38 $\mu\text{g/dL}$) vrednosti Pb^{2+} v krvi (35). Domnevajo, da naj bi asparagin, ki kodira za bolj elektronegativno varianto encima tesneje vezal Pb^{2+} v primerjavi z varianto encima z lizinom, kar bi lahko bila ena izmed možnih razlag tudi za večjo zastopanost tega alela pri koncentraciji Pb^{2+} nad 30 $\mu\text{g/dL}$. Nosilci alela Asn, pri katerih so prav tako opisali pomembno višje krvne koncentracije sečne kisline in serumskega kreatinina, naj bi izkazovali večje tveganje za ledvično toksičnost, kar naj bi podpirala tudi opažanja o toksičnosti Pb^{2+} na ostale ledvične parametre, kot so $\beta 2$ -mikroglobulin, $\alpha 1$ -mikroglobulin, N-acetil-D-glukozamin (37). Nasprotno pa sta ameriški raziskavi na 122 tesarjih in 688 gradbenikih dali nekoliko drugačne rezultate in polimorfizma *ALAD* nista povezali s koncentracijskimi razlikami Pb^{2+} v krvi. Poleg nezadostne razpoložljivosti podatkov in različnih pogojev eksperimentov bi ta nasprotja med študijami lahko pojasnili z različnimi postopki vzorčenja, nizko

frekvenco polimorfnege alela Asn ter nizko koncentracijo Pb^{2+} v krvi preučevane populacije (7,8 $\mu\text{g/dL}$) (35, 38). Obstajala naj bi namreč določena meja izpostavljenosti zanesljive detekcije razlik v koncentraciji Pb^{2+} ($\geq 30 \mu\text{g/dL}$) med posamezniki, medtem ko naj bi bile te razlike pri nižjih vrednostih ($\leq 10 \mu\text{g/dL}$) skoraj neopazne (35, 38, 39). Verjetno razlago za slednje lahko iščemo v zasičeni vezalni kapaciteti krvi za Pb^{2+} med 25 in 40 $\mu\text{g/dL}$, neustreznih pogojih vezave ter nestabilnosti vezavnih mest v eritrocitih (40).

Prav tako so bile pri nosilcih alela Asn v primerjavi s homozigoti Lys/Lys opisane statistično značilno višje razlike v koncentraciji Pb^{2+} med kortikalno in trabekularno kostnino (8,62 in 3,35 $\mu\text{g/g}$; $p=0,06$), kar pri slednjih nakazuje na bolj učinkovit privzem Pb^{2+} v kortikalen del kosti. Ti naj bi posledično imeli tudi večje telesno breme in s tem rizik za dolgotrajno izpostavljenost (39). Podobno je pokazala tudi študija na 726 ameriških delavcih, kjer so posamezniki z alelom Asn izkazovali manjšo absorpcijo v kortikalen del kosti in pri vrednostih Pb^{2+} v trabekularni kosti nad 60 $\mu\text{g/g}$ izrazitejšo mobilizacijo v krvni obtok (38). Ti posamezniki naj bi prav tako, kot posledica višje afinitete za Pb^{2+} , izkazovali pomembno nižje koncentracije z urinom izločenega DMSA-svinčevega kompleksa v primerjavi s homozigoti za alel Lys, kar lahko pomeni manjšo količino razpoložljivega svinca in stem tudi nižje plazemske koncentracije, ki opredeljujejo njegovo aktivno toksično obliko (35, 41). Kljub temu, da imajo nosilci alela Asn višje vrednosti Pb^{2+} v krvi, pa naj bi bili homozigoti Lys/Lys tisti z več neželenih učinkov na živčni (višje plazemske vrednosti δ -ALA in slabša nevro-vedenjska funkcija), kostni ter hematopoetski sistem. To potrjuje tudi študija 134 delavcev, kjer so slednji izkazovali pomembno višje ravni ZPP in koporfirina ter posledično nižje ravni hemoglobina pri vrednostih $Pb^{2+} \geq 40 \mu\text{g/dL}$ krvi (35, 42). Možno je, da so v tem primeru nosilci alela Asn bolj odporni na škodljiv vpliv svinca, ker ga sekvestirajo in naredijo nedostopnega za patofiziološki proces (39).

1.6 Sintaza dušikovega oksida (NOS)

Sintaza dušikovega oksida (NOS; EC 1.14.13.39) je ime za družino encimov, ki katalizira reakcijo dvostopenjske oksidacije L-arginina do NO, pomembne signalne molekule, vključene v vrsto fizioloških in patofizioloških procesov v telesu (43, 44, 45). Endotelijska (eNOS ali tip III) in nevronska (nNOS ali tip I) NOS sta konstitutivno izraženi izoformi, njuno aktivnost določajo znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} prek interakcije s kalmodulinom

(CaM), medtem ko inducibilna NOS (iNOS ali tip II) funkcionalno ni odvisna od Ca^{2+} in je aktivirana s CaM že pri bazalnih koncentracijah Ca^{2+} (43, 44).

1.6.1 Endotelijska sintaza dušikovega oksida (eNOS)

eNOS je homodimer z molekulsko maso 135 kDA, zgrajen iz dveh enakih podenot. Njuna dimerizacija je bistvena za katalitično aktivnost encima (43). Za stabilnost dimera so ključni štirje cisteini, po dva iz posamezne podenote, Cys⁹⁴ in Cys⁹⁹, ki jih povezuje en tetrahedralno vezan Zn^{2+} (46). Vsako podenoto sestavljata dve domeni, ki izkazujeta oksigenazno in reduktazno aktivnost. Oksigenazna domena na N-terminalnem koncu, ki je vključena v katalizo obeh stopenj sinteze NO in tvori aktivno mesto encima, vsebuje substrata L-arginin in O_2 ter dve redoks skupini, železov protoporfirin IX (hem) in (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH_4). Reduktazna domena na C-terminalnem koncu, ki služi kot vir elektronov za reakcijo, pa vsebuje vezavna mesta za nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) ter skupini flavin adenin dinukleotid (FAD) in flavin mononukleotid (FMN). Na tej domeni se nahaja tudi področje za vezavo od Ca^{2+} odvisnega CaM, ki omogoča prenos elektronov od NADPH na reduktazni domeni ene podenote do hema na oksigenazni domeni druge podenote preko FAD in FMN (43, 45, 47).

1.6.2 Fiziološka vloga eNOS

NADPH predstavlja vir elektronov reakcije, kot kofaktorji, nujni za prenos elektronov in aktivacijo encima pa sodelujejo še FAD, FMN, H_4B , Fe (III)-hem ter Ca^{2+} /CaM kompleks. Preko N ω -hidroksi-L-arginina (NOHA) poteče od nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) odvisna oksidativna deaminacija gvanidinskega dušika L-arginina do L-citrulina in NO (43, 44). Nastali NO, ki deluje kot endotelijski sproščujoč faktor (EDRF), prosto difundira v gladke mišice žil in tu preko vezave na Fe^{2+} hema aktivira v citosolu topno gvanilatno ciklazo (tGC). Tvori se ciklični gvanozin monofosfat (cGMP), ki nadalje preko vrste biokemijskih reakcij zmanjša koncentracijo znotrajceličnega Ca^{2+} in povzroči relaksacijo lahkih miozinskih verig (44). Pomembnost NO se kaže predvsem v kardiovaskularnem sistemu, ključen pa je tudi pri uravnavanju pretoka krvi skozi tkiva in s tem povezanim arterijskim tlakom (48, 49, 50). Povečana tvorba ROS, ki vodi v t.i. stanje oksidativnega stresa in posledično zmanjšano antioksidativno sposobnost organizma, naj bi bila eden izmed ključnih mehanizmov nastanka arterijske hipertenzije pri dolgotrajni

izpostavljenosti Pb^{2+} (23, 26). Študije na kulturah živali, kjer so po eksperimentalno povzročeni hipertenziji na podganah, tretiranih z 0,01% $Pb(CH_3COO)_2$, ugotovili povečano tvorbo ROS, so pokazale zmanjšano razpoložljivost biološko aktivnega NO, kot posledica njegove povečane porabe in/ali inaktivacije s superoksidnim anionom (26, 47). Glede na zmanjšani NO bi pričakovali tudi zmanjšano ekspresijo endotelijske sintaze NO, vendar študije kažejo, da Pb^{2+} preko povečane tvorbe ROS zmanjša sproščanje NO, po drugi strani pa zmanjšano sproščanje slednjega spodbudi endotelijske celice k večji sintezi NO in s tem h kompenzatorno značilno povečani ledvični in kardiovaskularni ekspresiji eNOS ($p < 0,002$). Značilno znižani pa sta koncentraciji plazemskega in urinarnega NO_x (NO^{2-}/NO^{3-} ; $p < 0,01$), pokazatelja endogenega nastajanja NO. Nastali peroksinitrit ($ONOO^-$) reagira s številnimi biološkimi molekulami in povzroča lipidno peroksidacijo, kar privede do nastanka visoko reaktivnega hidroksilnega radikala ($OH^\cdot$) ter inaktivacije kofaktorja BH_4 . Aktivirajo se specifične signalne poti in redoks občutljivi transkripcijski faktorji, med njimi tudi transkripcijski dejavnik kappa B (angl. *Nuclear Factor κB* - NF- κB), ki spodbuja izražanje številnih provnetnih citokinov, kemokinov (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) ter adhezijskih molekul. Nadaljnje zmanjšano izražanje sGC in nastajanje cGMP se kažeta v porastu citosolne koncentracije kalcija $[Ca^{2+}]_i$ v gladkih mišičnih celicah krvnih žil in povečanem perifernem uporju ter posledično porastu krvnega tlaka in nastanku hipertenzije (23, 47).

1.6.3 Polimorfizem Asp298Glu v genu za eNOS

Gen, ki kodira za endotelijsko sintazo dušikovega oksida (eNOS), se nahaja na daljši ročici kromosoma 7 (območje 7q35-36) in obsega 21-22 kB. Vsebuje 26 eksonov in 25 intronov. Promotorska regija gena je brez zaporedja TATA, sestavljajo pa jo GC bogata področja (51). eNOS je izražena v endotelih celicah različnih tkiv, v kardiomiocitih in trombocitih, najdemo pa jo tudi v epitelih celicah ledvic ter dihalnih poti (43).

V genu za eNOS so doslej opisali več polimorfizmov, povezanih s tveganjem za različne kardiovaskularne bolezni, miokardnim infarktom, aterosklerozo, trombozo, angino pectoris, preklampsijo ter pljučno in arterijsko hipertenzijo (44). Današnje raziskave so usmerjene v preučevanje predvsem treh klinično pomembnih alelnih variant tega gena: -786T>C (rs2070744) v promotorski regiji, c.894G>T (rs1799983) v eksonu 7 ter 4a/4b VNTR v intronu 4 (44, 50). c.894T>G (Asp298Glu, rs1799983), ki vsebuje transverzijo nukleotida T v nukleotid G na mestu 894 v eksonu 7 kodirajoče regije eNOS, povzroči

zamenjavo asparaginske kisline (Asp) z glutaminsko kislino (Glu) na mestu 298 (44, 52, 53). Polimorfizem, katerega frekvenca pojavljanja je najvišja med belci (34,5%), nekoliko manjša med Afroameričani (15,5%) in najnižja med Azijci (Kitajci 4%, Korejci 4,5%, Japonci 0,1%), zaenkrat še nima razumljive funkcijske razlage (54). *In vitro* študije na človeških endotelnih celicah in vaskularnih tkivih kažejo na povečano občutljivost Asp variante encima za proteolitično cepitev, pri čemer nastaja manj aktivna oblika eNOS, kot posledica strukturno spremenjenega α -heliksa (44). Tako spremenjen protein naj bi imel do dvakrat nižjo aktivnost eNOS z dokazano nižjo bazalno sintezo in razpoložljivostjo biološko aktivnega NO pri nosilcih alela Asp, kot tudi značilno nižje koncentracije z urinom izločenega NO_x (NO²⁻/NO³⁻) ter višje koncentracije O₂⁻ *ex vivo* (52).

Meta analiza 14 objavljenih študij, ki je preučevala 12142 posameznikov različnih etničnih skupin, je v povezavi z eNOS opisala statistično značilno višje tveganje za razvoj miokardnega infarkta pri Japoncih, Nemcih, Angležih in Američanih, medtem ko te povezave pri grški, korejski in nizozemski populaciji niso uspeli dokazati (48). Kot rizičen se je izkazal alel Asp, ki naj bi kot tak vplival tudi na nastanek, razvoj in kasnejše zaplete koronarne arterijske bolezni v italijanski populaciji, v nekaterih populacijah pa poročajo o značilni povezavi tega alela tudi z nastankom arterijske hipertenzije (44, 50). Vse populacije pa nimajo enake genetske predispozicije za razvoj hipertenzije, kar sta potrdili tudi dve manjši neodvisni študiji (55). Tako npr. alel Asp, ki v japonski populaciji predstavlja tveganje za razvoj hipertenzije, v kavkaški populaciji deluje zaščitno ali pa nanjo nima nobenega vpliva (50, 55, 56). Drugi dve značilno večji študiji povezanosti v tej smeri nista podali, kar bi poleg etničnih razlik med populacijami lahko pojasnili z nezadostno velikostjo vzorca in genetsko strukturo preiskovancev. Možno je tudi, da je v primeru manjših vzorcev povezava le naključna in zato lažno pozitivna (55). Opisani polimorfizem pa verjetno ni edini, ki prispeva k nastanku te bolezni, ampak je posledica zapletene interakcije večjega števila različnih genov ali SNP-jev (-786T>C, 4a/4b) istega gena v povezavi z dejavniki okolja (spol, starost, alkohol in kajenje) (56). V literaturi zasledimo več opisov možnega vpliva Pb²⁺ na plazemske koncentracije NO pri hipertenzivnih bolnikih, ki naj bi bile statistično značilno nižje pri posameznikih z alelom Asp v primerjavi s homozigoti Glu/Glu. Kohortna študija, ki je vključevala 793 korejskih delavcev, pa značilne povezanosti polimorfizma eNOS z razlikami v koncentraciji Pb²⁺ in njihovega morebitnega vpliva na zmanjšano nastajanje in razpoložljivost biološko aktivnega NO ter s tem zvišano tveganje za razvoj arterijske hipertenzije med posamezniki

genotipi ni ugotovila. V primeru genotipa Glu/Glu sicer poročajo o nekoliko višjih povprečnih vrednostih Pb^{2+} v kortikalnem delu kosti glede na tiste z alelom Asp, vendar so te razlike premajhne, da bi jih označili za statistično značilne ($p=0,9$) (56). Odsotnost povezave je lahko posledica premajhne velikosti vzorcev z rizičnim alelom Asp (56), kot tudi strukturne in genetske raznolikosti preiskovane populacije (55). V nasprotju s tem pa je podobna študija na populaciji 652 korejskih delavcev opisala značilno višji porast Pb^{2+} koncentracije v trabekularni kosti z naraščajočo starostjo pri posameznikih z alelom Asp ($p=0,04$) (53, 57). Koncentracija Pb^{2+} je bila tako pri nosilcih alela Asp v povprečju nižja kot pri homozigotih Glu/Glu (72,2 $\mu\text{g/g}$ in 75,6 $\mu\text{g/g}$), vendar statistično neznačilna ($p=0,39$) (57). Ti so v primerjavi s homozigoti za alel Glu izkazovali tudi pomembno višje koncentracije serumskega kreatinina in nižje koncentracije sečne kisline ($p=0,04$) (53).

1.7 S prenosom protonov sklopljeni oligopeptidni prenašalci (POT)

Proton odvisna skupina oligopeptidnih prenašalcev (angl. *Proton-Coupled Oligopeptide Transporters* - POT) (PTR; TC 2.A.17) so del velike družine polispecifičnih membranskih prenašalcev za topljence (angl. *Solute Carrier Proteins* - SLC15), odgovornih za prenos številnih manjših fiziološko pomembnih peptidnih molekul preko apikalne površine celičnih membran. Predstavniki te skupine so PEPT1 (*SLC15A1*), PEPT2 (*SLC15A2*), PHT1 (*SLC15A4*) ter PHT2 (*SLC15A3*), ki delujejo na osnovi gradienta koncentracije protonov (H^+) in negativnega membranskega potenciala, ustvarjenega s strani primarnih aktivnih prenašalcev. Precejšnjo stopnjo homologije v aminokislinskem zaporedju pri določeni vrsti med seboj iskazujejo skupine encimov PEPT1, PEPT2 ter PHT1 in PHT2 (50%), medtem ko naj bi homologija zaporedja med PEPT in PHT bila le 25% (58, 59, 60).

1.7.1 Peptidni prenašalec 2 (PEPT2, *SLC15A2*)

Peptidni prenašalec 2 (PEPT2, *SLC15A2*) je integralni transmembranski (TM) protein iz zaporedja 729 aminokislin, velikosti 107 kDa, ki se po deglikolizaciji zmanjša na 83 kDa. Osnovna struktura sestoji iz dvanajstih hidrofobnih transmembranskih α -heliksov (TM1-12), povezanih s petimi znotrajceličnimi in šestimi zunajceličnimi hidrofilnimi zankami, katerim sledita v citosolu nahajajoča se N- in C-terminalna konca (59, 61, 62). Za PEPT2 značilna 165 aminokislin dolga peta zunajcelična zanka, ki povezuje segmenta TM9 in

TM10, vsebuje zaporedje določenih aminokislin, ki delujejo kot potencialna N-glikozilacijska, protein kinaza C (PKC) (59, 63) ter SGK1 fosforilacijska mesta (64). Večino fenotipskih značilnosti PEPT2 (substratno afiniteto in specifičnost, elektrofiziološke lastnosti, pH odvisnost) pogojuje prva polovica N-terminalnega konca do TM9. Transmembranski segmenti na tem koncu tvorijo centralno, pori podobno hidrofilno strukturo, TM7, TM8 in TM9 s pripadajočimi zankami in ostanki histidina pa substrat vezavno mesto. Vezava H^+ in protoniranje aminske skupine His⁸⁷ v TM2 in His¹⁴² v TM4 naj bi bila ključna za transportno aktivnost prenašalca ter učinkovit prenos substrata v trans konformaciji, za prepoznavo katerega peptidna vez naj ne bi bila nujna (59, 62). C-terminalno nahajajoči se PDZ vezavni tripeptidni motiv tipa I (T-K-L) preko različnih signalnih poti sodeluje pri vezavi PEPT2 na ciljne proteine in interagira s PDZ (PSD-95/DglA/ZO-1) vezavnimi domenami t. i. ogrodnih proteinov (64, 65).

1.7.2 Fiziološka vloga PEPT2

Od natrija neodvisna skupina prenašalnih proteinov PEPT2, ki za prenos di- in tripeptidnih substratov kot gonilno silo uporablja $\Delta\mu H^+$ (59, 63), deluje na osnovi terciarnega aktivnega transporta, ustvarjenega s strani apikalno nahajajočega se sekundarnega izmenjevalca NHE3 (59). Primarno mesto njegovega izražanja so epitelne celice S2 in S3 segmentov ledvic, bronhijev pljuč, ependimske in subependimske celice možganov, astrociti ter epitelne celice horioidnega pleteža. V proksimalnih ledvičnih tubulih sodeluje pri reabsorpciji dušik-vsebujočih spojin v obliki manjših di- in tripeptidov iz glomerulnega filtrata, β -laktamskih antibiotikov ter drugih peptidom podobnih zdravilnih učinkovin (ACE inhibitorji, predzdravila nukleozidov) (58, 61). Zelo pomembna vloga PEPT2 je tudi v CZS, kjer kot del pregrade med krvjo in cerebrospinalno tekočino (CSF) selektivno regulira prehajanje mnogih endogenih in eksogenih snovi (slabo lipidotopna zdravila, okoljski toksini) v osrednje živčevje ter pospešuje eliminacijo oz. efluks potencialno toksičnih peptidomimetičnih ksenobiotikov iz CSF v krvni obtok (59, 66). S selektivno omejenostjo prehajanja snovi v CSF zagotavlja zaščito in stabilno okolje možganskega intersticija ter uravnava zunajcelično homeostazo neuropeptidov, kar je zlasti pomembno pri endogenih substratih PEPT2, kot je δ -aminolevulinska kislina (δ -ALA) (67, 68, 69).

Raziskave na hipokampalnih kulturah astrocitov neonatalnih podgan, izpostavljenih 0,2% ali 1,0% $Pb(CH_3COO)_2$, so pokazale porušenje organiziranosti proteinov tesnih stikov,

ključnih za oblikovanje tesnostičnega prepleta, ter zmanjšano tesnost hematoencefalne in krvno-cerebrospinalno tekočinske bariere (13). Povišana prepustnost bariere epitelijskih celic horoidnega pleksusa in motena/zmanjšana raven izražanja ali transportne funkcije apikalno vezane PEPT2 (58), ki deluje nevroprotektivno ter kot taka omejuje prehajanje δ -ALA v CSF in možganski intersticij, vodi v zvišano koncentracijo vmesnih toksičnih intermediatov, vključno z δ -ALA (68, 69). Sam mehanizem prehoda Pb^{2+} preko opisanih pregrad do njihovega privzema in kopičenja v astrocitih je zapleten in še nejasen. Najverjetneje zaradi biološke analognosti s Ca^{2+} ioni, le-ti vstopajo v celico preko Ca^{2+} -ATPaze in se nadalje vključujejo v številne od Ca^{2+} odvisne celične procese (13, 68).

1.7.3 Polimorfizma *Leu350Phe* in *Arg509Lys* v genu za *PEPT2* (*SLC15A2*)

Gen, ki nosi zapis za humani oligopeptidni prenašalni protein PEPT2, se nahaja na daljši ročici kromosoma 3 (3q13.3-21) in se razteza preko 47 kb (70). Vsebuje 22 eksonov in 21 intronov ter odprt bralni okvir (angl. *Open reading frame* - ORF), dolžine 2190bp (59, 63).

V genu za *PEPT2* so odkrili številne polimorfizme posameznega nukleotida (SNPs), katerih funkcionalne posledice še niso popolnoma jasne (68, 69, 70). Tri najbolj pogoste in klinično pomembne kodirajoče variante *PEPT2* (c.1048T>C, c.1526G>A in c.1225T>C), ki jih povezujejo s spremembami aminokislinskega zaporedja, razlikami v strukturi in afiniteti vezavnih mest ter delovanjem ali transportno funkcijo proteina, ležijo v neposredni bližini druga druge in preko vezalnega nesorazmerja desetih SNP-jev tvorijo blok večih haplotipov, velikosti 6 kb. Pri prvi gre za zamenjavo levcina s fenilalaninom (*Leu350Phe*, rs2257212) v eksonu 13 kodirajoče regije *PEPT2*, kot posledica transverzije citozina v timin na mestu 1048 (c.1048T>C) osme transmembranske domene (TM8) proteina. Druga dva precej pogosta SNP-ja v peti zunajcelični zanki PEPT2 se kažeta v transverziji gvanina z adeninom na mestu 1526 (c.1526G>A) in zato zamenjavi arginina z lizinom v eksonu 17 (*Arg509Lys*, rs1143672) ter transverziji citozina s timinom na mestu 1225 (c.1225T>C) in zato zamenjavi serina s prolinom v eksonu 13 (*Ser409Pro*, rs1316300) (70). V haplotipski študiji genotipizacije 247 vzorcev (27 SNP-jev) so ugotovili, da se vse tri spremembe ponavadi dedujejo skupaj ali vezano kot alelni varianti *PEPT2*1* in *PEPT2*2*, ki se med seboj razlikujeta v treh aminokislinah ter kot taki oblikujeta dva glavna haplotipa. *Leu350-Ser409-Arg509* (CCG) je označen kot haplotip *PEPT2*1* (divji tip) in *Phe350-Pro409-Lys509* (TTA) kot *PEPT2*2* (70). Encimske kinetične študije *in vitro* na CHO celicah

kitajskega hrčka so pri zunajceličnem pH 6,0 pokazale za približno trikrat značilno nižjo vezavno kapaciteto Gly-Sar za *PEPT2*2* v primerjavi s *PEPT2*1* ($K_m=83\pm16$ in 233 ± 38 μM ; $p<0,05$) (67, 68, 69). Obe varianti sta visoko prisotni pri večini etničnih skupin in imata približno enako frekvenco pojavljanja tako pri belcih (44-49%) kot pri Afroameričanih (45-53%), medtem ko pri Azijcih prevladuje varianta *PEPT2*2* (65%). Ostali haplotipi, izmed njih tudi varianta *PEPT2*3* (1,6%), so zelo redki in se pojavljajo s frekvenco 2% ali manj, odvisno od preiskovane populacije (70). Raziskava iz leta 2011 poroča o statistično značilni povezavi kombinacije omenjenih polimorfizmov (haplotipa *PEPT2*2*) s koncentracijami Pb^{2+} v krvi vzorcev 306 okoljsko izpostavljenih otrok, in sicer le pri fantih, medtem ko pri dekletih ta povezava ni bila pomembna. V modelu linearne regresije so *PEPT2*2/2* homozigoti izkazovali značilno višje povprečne vrednosti Pb^{2+} glede na tiste brez tega alela (4,9 in 2,6 $\mu\text{g/dL}$; $p<0,001$), kar naj bi se kazalo v višjem telesnem bremenu Pb^{2+} in riziku za dolgotrajno izpostavljenost (68, 69). Natančen mehanizem teh razlik med spoloma še ni popolnoma jasn, predvideva pa se, da pri fantih s *PEPT2*2* varianto prihaja do razlik v načinu zniževanja reabsorpcije beljakovin v proksimalnih ledvičnih tubulih in zato povečani proizvodnji skupine vsaj 100 različnih proteinov (68). Kot posledica zmanjšane prenosa oz. efluksa δ -ALA iz CSF v krvni obtok preko krvno-cerebrospinalnotekočinske bariere s prenašalnim proteinom PEPT2 (68, 69), prihaja do porasta in kopičenja možganske δ -ALA ter s tem dokazano povišanega tveganja za neželene učinke na živčevje pri teh posameznikih, kar so potrdili tudi v študijah na *knockout* miškah. Tu sta bila koncentracija δ -ALA v CSF in razmerje koncentracij δ -ALA v CSF ter krvi pričakovano 5-8-krat značilno višja pri *PEPT2*^{-/-} kot pri *PEPT2*^{+/+} (*wild-type*) miših ($p<0,001$). Podobne rezultate navajajo tudi v predhodnih študijah, kjer študija vpliva nevrotoksičnosti Pb^{2+} na kognitivne lastnosti 252 otrok iz leta 2015 (69), poroča o vpletenosti δ -ALA v stimulacijo glutamatnega in/ali gabanergičnega sistema na večih molekularnih nivojih ter inhibiciji Na^+/K^+ -ATPaze in adenilat ciklazne aktivnosti ter zato slabši nevro-vedenjski funkciji posameznikov s *PEPT2*2* alelom (67, 69). Da pa bi zgoraj navedene zaključke lahko potrdili zagotovo, bi bilo potrebno nadaljnje študije opraviti na večjih skupinah *PEPT2*2/2* homozigotov (68, 69).

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil natančneje analizirati **povezanost polimorfizmov genov Lys59Asn v ALAD, Asp298Glu v eNOS ter Leu350Phe in Arg509Lys v PEPT2; SLC15A2 s koncentracijo Pb²⁺ v krvi populacije slovenskih steklobruscev ter tako oceniti interakcije med izbranimi geni in občutljivostjo na toksičnost ionov svinca.**

Zaradi različnega načina življenja, različne dobe in jakosti izpostavljenosti ter razlik glede samega sprejema svinca in občutljivosti nanj, kot posledica genetskih značilnosti posameznika, se pri vseh posledice izpostavljenosti namreč ne bodo pokazale. Določeni posamezniki bodo tako bolj dovzetni za omenjeno toksičnost, ki se bo kazala v zmanjšani aktivnosti encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline (ALAD), s posledično zmanjšano sintezo eritrocitov in koncentracijo hemoglobina v krvi. Opažene naj bi bile tudi znižane aktivnosti encima endotelijske NO sintaze (eNOS) s povišanim sistoličnim tlakom in posledično pojavom kardiovaskularnih obolenj. Nevrotoksični učinki ionov svinca naj bi bili povezani z zmanjšanim delovanjem peptidnega prenašalca 2 (PEPT2), ki normalno znižuje koncentracijo δ -ALA v cerebrospinalni tekočini. Pri teh delavcih bomo prav tako skušali ugotoviti, ali so polimorfizmi v omenjenih genih in posledično znižana aktivnost pripadajočih encimov res povezani z višjimi vrednostmi Pb²⁺ v krvi.

Iz izoliranih DNA vzorcev 112 preiskovancev bomo pomnožili tarčne odseke DNA in nato izbrane polimorfizme genotipizirali z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času. Dobljene rezultate bomo statistično ovrednotili in poskušali poiskati povezavo omenjenih polimorfizmov s predhodno določenimi koncentracijami Pb²⁺ v krvi in biokemičnimi kazalci njihovega toksičnega delovanja. Rezultati raziskave bodo pripomogli k boljšemu razumevanju genetskih dejavnikov, vpletenih v toksikokinetiko Pb²⁺ in k identifikaciji tistih posameznikov z domnevno višjimi vrednostmi Pb²⁺ v telesu ter posledično višjo genetsko občutljivostjo za njihovo toksično delovanje.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovana skupina steklobruscev

V raziskavo, ki je bila odobrena s strani komisije RS za medicinsko-etična vprašanja, smo vključili skupino 112 steklobruscev Steklarne Rogaška d.d., od tega 80 žensk in 32 moških s povprečno starostjo $44,03 \pm 3,93$ let. Klinični vzorci za izolacijo DNA in določanje koncentracije Pb^{2+} v krvi preiskovancev so bili zbrani s strani pooblaščenega specialista za Medicino dela, promet in šport (MDPŠ) Steklarne Rogaška dr. Tihomirja Ratkajca, v obdobju 2006-2009. Preiskovanci, katerim so bile ob vključitvi v raziskavo določene tudi vrednosti diastoličnega in sistoličnega krvnega tlaka, so bili različne starosti, spola ter z različno dolgo delovno dobo. Vsi sodelujoči so bili s potekom in namenom študije natančno seznanjeni in so podali tudi pisno soglasje za vključitev vzorcev v študijo.

3.1.1 Določanje koncentracije Pb^{2+} v polni krvi

Koncentracija Pb^{2+} v polni krvi je bila določena z metodo elektrotermične atomske absorpcijske spektrometrije (angl. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* - GFAAS) na absorpcijskem spektrometru Varian Spektar AA-800 (Varian Ltd Mulgrave, Victoria, Australia). Na osnovi povprečnih vrednosti Pb^{2+} štiriletnega obdobja smo določili tudi hitrost upada njihove koncentracije v krvi (dPb 2006_2009), ob stalni enakomerni izpostavljenosti delavcev. dPb 2006_2009 smo opredelili kot razliko med povprečjem meritev koncentracij Pb^{2+} med letoma 2006 in 2009. Meritve so bile opravljene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana.

Metoda temelji na pretvorbi analita do osnovnega stanja prostih atomov, ki absorbirajo svetlobo specifičnih valovnih dolžin. Količina pri tem absorbirane svetlobe je sorazmerna koncentraciji analita v vzorcu. Atomizacijo in s tem pridobivanje prostih atomov izvedemo s pomočjo večstopenjskega segrevanja grafitne cevke z visokimi tokovi. Segrevanje poteka v treh stopnjah, kjer s spreminjanjem temperature pomembno vplivamo na proces njihovega nastanka. Vzorec najprej v majhnih količinah (5-50 μ L) vnesemo skozi odprtino na zgornjem delu cevke in ga nato v prvi fazi (100°C) posušimo, da odstranimo topilo. Sledi faza razkroja (300-900 °C), kjer odstranimo vse komponente vzorca, razen analita. V zadnji fazi (2500°C) grafitno cevko segrejemo do temperature, ki je potrebna za

atomizacijo določanelega elementa. Grafitno cevko, ki se nahaja v večji cevi, prepihujemo z argonom in s tem zagotovimo inertno okolje v njeni notranjosti. Korekcijo ozadja in s tem vplivov, ki so razlog absorbanke pri nespecifičnih valovnih dolžinah, izvedemo z Zeemanovim efektom. Delo izvajamo v čisti sobi s filtriranim zrakom in na ta način zmanjšamo možnost kontaminacije iz okolice. Uporabljamo polipropilenski laboratorijski pribor, pomit s kislino. Če je potrebno, le-tega čez noč namočimo v 4% HNO_3 in s tem zagotovimo ustrezno stopnjo njegove čistosti. Po potrebi preverimo tudi morebitno kontaminacijo namakalne raztopine, katere vsebnost svinca mora biti na meji detekcije ali pod njo ($0,015 \mu\text{g/L}$) (2). Uporabimo reagente visoke stopnje čistosti (suprapur quality). Za kalibracijo uporabljamo Merckov vodni standard različnih koncentracij in Seronorm Trace Elements Whole Blood. Točnost meritev preverimo s pomočjo kontrolnega materiala Seronorm Trace Elements Whole Blood, katerega analizo opravimo pred, med in po delu.

3.1.2 Določanje biokemičnih kazalcev toksičnosti Pb^{2+}

Pri ugotavljanju povezanosti polimorfizmov izbranih genov s koncentracijami Pb^{2+} v krvi smo upoštevali naslednje klinične in biokemične parametre preiskovancev: koncentracijo hemoglobina (Hb) in hematokritno vrednost (Ht - volumen stisnjenih eritrocitov) v krvi, eritrocitni protoporfirin (EP), aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kisline (ALAD) v eritrocitih, serumsko koncentracijo cistatina C ter katalitično aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT) in gama-glutamilttransferaze (GGT) v serumu. Meritve so bile opravljene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, UKC Ljubljana.

Koncentracija hemoglobina (Hb) in hematokritna vrednost (Ht) sta bili določeni s pomočjo hematološkega analizatorja Beckman Coulter. Analizator omogoča avtomatski izračun hematokrita iz povprečnega volumna eritrocitov (MCV) in števila krvnih celic, medtem ko koncentracijo hemoglobina določi fotometrično s hemiglobincianidno metodo. Metoda temelji na dvostopenjski reakciji, kjer v prvi stopnji iz hemolizатов sproščeni hemoglobin oksidiramo s kalijevim heksacianoferatom (III), nato pa na nastali methemoglobin vežemo kalijev cianid. Pri tem nastali obarvan produkt (cianmethemoglobin), katerega absorbanco merimo pri 525 nm, je sorazmeren koncentraciji hemoglobina v vzorcu.

Aktivnost eritrocitne dehidrataze δ -aminolevulinske kisline (ALAD) je bila določena na spektrofotometru Shimadzu UV-160 po evropsko standardizirani metodi Berlin in Schaller. Metoda temelji na barvni reakciji porfobilinogena z modificiranim Erlichovim reagentom, pri čemer se tvori rožnato obarvan kompleks. Intenzivnost obarvanosti raztopine, kot posledica nastalega produkta, je sorazmerna aktivnosti ALAD, ki jo določimo fotometrično pri 555 nm. Pri tem uporabljeni reagenti ne smejo vsebovati Pb^{2+} in Zn^{2+} , saj že nizke koncentracije Hg^{2+} , Cd^{2+} in EDTA motijo analizo, ki jo je priporočljivo izvesti čimprej po zbiranju vzorca. Razlog za slednje je v občutljivosti vzorcev na svetlobo in nestabilnosti dehidrataze δ -aminolevulinske kisline pri sobni temperaturi.

Serumske aktivnosti alanin-aminotransferaze (ALT) in gama-glutamiltransferaze (GGT) so bile določene z encimsko-barvnim testom, ki temelji na spektrofotometričnem določanju produkta. Meritve so bile opravljene na analizatorju Roche/Hitachi 917.

- ALT katalizira reverzibilno reakcijo med L-alaninom in 2-ketoglutarno kislino. Nastali piruvat v prisotnosti piridoksal-5-fosfata in laktat dehidrogenaze reduciramo z NADH do laktata in NAD^+ . Redukcija NADH v NAD^+ ima za posledico padec absorbance, ki jo izmerimo pri 340 nm in je sorazmerna encimski aktivnosti alanin-aminotransferaze.
- GGT katalizira reakcijo prenosa proste glutamilne skupine na glicilglicin, ki se sprost pri razgradnji substrata L-gama-glutamil-3-karboksi-4-nitroanilida. Nastajata gama-glutamilglicilglicin in obarvani 5-amino-2-nitrobenzoat, katerega absorbanco določimo pri 405 nm in je sorazmerna encimski aktivnosti gama-glutamiltransferaze v vzorcu.

Koncentracija cistatina C v krvnem serumu je bila določena na spektrofotometričnem analizatorju Roche/Hitachi Modular z imunoturbidimetrično metodo in reagenčnim kompletom DAKO (Danska). Metoda temelji na principu specifičnih človeških protiteles, vezanih na molekule polistirena, ki ob prisotnosti cistatina C v vzorcu aglutinirajo oziroma tvorijo netopne imunske komplekse. Spremembo motnosti raztopine, ki je sorazmerna količini cistatina C v vzorcu, določimo fotometrično pri 340 nm.

3.2 Izolacija DNA in njeno vrednotenje

Preiskovancem so z dodatkom antikoagulant K₃EDTA odvzeli periferno vensko kri in jo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C. V naslednjih dneh smo s pomočjo komercialnega kompleta FlexiGene DNA Kit 250, Qiagen, iz levkocitov odvzete krvi izolirali genomsko DNA. Komplet je vseboval optimiziran protokol in reagente z različno sestavo kemikalij, ki smo jih pripravili v skladu z navodili proizvajalca. Glede na predhodno optimiziran protokol smo odpipetirali ustrezno količino reagentov za izolacijo DNA iz 3 ml vzorca periferne venske krvi, katerih volumske količine so podane v **Preglednici I**. Pri rokovanju z vzorci smo obvezno uporabljali zaščitno haljo in rokavice brez smukca za 1-kratno uporabo ter s tem zmanjšali možnost morebitne kontaminacije reagentov in vzorčne DNA s tujimi snovmi.

Preglednica I: Volumni reagentov za izolacijo DNA iz 3 ml vzorca periferne venske krvi.

Reagent	Volumen reagenta (ml)	Volumen krvi (ml)
FG2/QiagenProteaza	7,5	3,0
pufer FG1	0,3	3,0
pufer FG3	1,5	3,0
100% izopropanol	1,5	3,0
70% etanol	1,5	3,0

Priprava reagentov in delovni postopek:

- Liofilizirani QIAGEN Proteazi dodamo 1,4 ml resuspenzijskega pufru FG3 (FlexiGene DNA Kit 250, Qiagen), dobro premešamo in raztopljeno Proteazo shranimo v hladilnik pri temperaturi 4°C (2 meseca) ali pa jo alikvotirano po 5 µl zamrznemo pri -20°C.
- Mešanico pufru FG2/QIAGEN Proteaze pripravimo največ eno uro pred začetkom izolacije DNA. Za vsak ml krvi zmešamo 500 µl denuracijskega pufru FG2 (FlexiGene DNA Kit 250, Qiagen) in 5 µl raztopljene QIAGEN Proteaze.
- Vzorce zamrznjene krvi, shranjene pri -20°C, hitro prenesemo iz zamrzovalnika v vodno kopel (37°C), da se pravočasno odtalijo. Pri tem jih rahlo stresamo, da pospešimo odmrzovanje in do analize shranimo na ledu.
- Odmrznjeno kri pred dodatkom reagentov centrifugiramo 5 minut na 2500 x g pri 4°C.
- 3 ml vzorca krvi prenesemo v 15 ml centrifugirko, v katero predhodno odpipetiramo 7,5 ml pufru za lizo celic FG1 (FlexiGene DNA Kit 250, Qiagen).

- Vsebino centrifugirke dobro premešamo z obračanjem (5-krat), da dobimo homogeno raztopino vzorca in jo nato 8 minut centrifugiramo na 2500 x g pri 4°C.
- Pazljivo odlijemo supernatant in centrifugirko pustimo 2 minuti na čistem papirju obrnjeno navzdol, da se odstrani še preostanek. **Pri tem pazimo, da pelet ostane v centrifugirki in ga ne izgubimo.**
- Dodamo 1,5 ml mešanice pufra FG2/QIAGEN Proteaze in vsebino takoj zmešamo na vorteksu, da se pelet homogenizira (4-krat po 5 sekund). Uporabljena mešanica prispeva k odstranitvi proteinov s pomočjo termodinamskega efekta kaotropnih soli.
- Po vorteksiranju centrifugirko 3-krat obrnemo in jo 10 minut inkubiramo v vodni kopeli, predhodno segreti na 65°C. Barva raztopine se spremeni iz rdeče v zeleno.
- Po 10 minutni inkubaciji raztopini DNA dodamo 1,5 ml 100% izopropanola in pri tem centrifugirko dobro premešamo z obračanjem (20-krat). Ta korak je ključnega pomena za izolacijo DNA in ga izvajamo, dokler se DNA ne obori in oborina ne postane vidna (temna barva).
- Raztopino vzorca ponovno centrifugiramo 5 minut na 2500 x g.
- Odstranimo supernatant in centrifugirko ponovno pazljivo obrnemo navzdol, jo položimo na čist papir in čakamo, da se odstrani še preostanek. **Pazimo, da pelet ostane v centrifugirki in ga ne izgubimo.**
- Dodamo 1,5 ml 70% etanola za čiščenje DNA in sproti vorteksiramo 5 s.
- Ponovno centrifugiramo 5 minut na 2500 x g.
- Odstranimo supernatant in še zadnjič centrifugirko pustimo stati 5 minut na čistem papirju, obrnjeno navzdol.
- Pelet sušimo na zraku vsaj 5 minut, da ves etanol odpari. Izogibamo se prekomernemu sušenju DNA, saj je preveč suho DNA kasneje težko raztopiti.
- Peletu dodamo 300 µL pufra FG3 in vorteksiramo 5 sekund na majhni hitrosti.
- Sledi 1-urna inkubacija vzorcev v vodni kopeli na 65°C. Če se DNA ne raztopi v predpisanem času, vzorce dodatno inkubiramo še čez noč.
- Raztopine vzorcev DNA vzamemo iz vodne kopeli in jih 5 minut centrifugiramo na 2500 x g pri 4°C, dokler ne dobimo homogene raztopine vzorca.
- Vzorce raztopljene DNA prepipetiramo v 1,5 ml plastične epruvetke s pokrovčkom in jih do uporabe shranimo v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C.

3.2.1 Določanje koncentracije in čistosti izolirane raztopine DNA vzorca

Koncentracijo nukleinskih kislin, ki imajo značilen absorpcijski maksimum pri 260 nm, smo določili spektrofotometrično na analizatorju NanoDrop ND-1000. Meritve smo opravili v treh ponovitvah, še pred tem pa smo aparat umerili z 1,5 µL avtoklavirane ultra čiste vode in s tem zagotovili večjo natančnost meritev. Na optično vlakno aparata smo nanesli po 1,5 µL izolirane DNA in ji določili absorbanco pri treh različnih valovnih dolžinah: 260, 280 ter 230 nm. Pri valovni dolžini 280 nm značilno absorbirajo proteini, pri 230 nm pa so to nečistote, kot so polisaharidi in ostanki ekstrakcijskih kemikalij (fenol, etanol, izopropanol ter EDTA). Prisotnost slednjih v vzorcu značilno vpliva na čistost izolirane DNA, ki smo jo določili iz razmerja absorbank pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm ter iz razmerja absorbank pri 230 in 260 nm. Raztopina čiste DNA ima vrednost prvega razmerja približno 1,8, medtem ko je ta vrednost pri drugem razmerju večja od 2,2. Če je prvo razmerje večje od 1,8, lahko sklepamo na prisotnost RNA v vzorcu, v nasprotnem primeru pa na prisotnost proteinov ali fenolov.

3.2.2 Redčenje raztopine DNA vzorca

Za uspešno genotipizacijo potrebujemo delovne raztopine DNA ustreznih koncentracij, ki smo jih pripravili glede na predhodno izmerjene koncentracije osnovnih raztopin vzorcev. S pomočjo redčenja, ki smo ga izvedli v dveh korakih, smo v 0,5 mL plastične epruvetke odpipetirali po 2 µL vzorčne DNA in dopolnili z avtoklavirano ultra čisto vodo do 50 µL. Epruvetke z napipetirano vsebino smo dobro zaprli, jih na hitro vorteksirali, da se je njihova vsebina enakomerno premešala ter centrifugirali. Tako pripravljene raztopine vzorcev smo previdno prenesli na mikrotitrsko ploščico s kapaciteto 96 vzorcev in jih ustrezno redčili do končne koncentracije 4,21 ng/µL. Ploščico z raztopinami delovne DNA, ki so nadalje služile za genotipizacijo, smo do analize hranili v hladilniku pri 4°C.

3.2.3 Reagenti in oprema

REAGENTI:

- reagenčni komplet FlexiGene DNA Kit 250 (Qiagen GmbH, Nemčija), ki vsebuje: FG3 lizni pufer, FG2 denaturacijski pufer, FG1 resuspenzijski pufer, QIAGEN® Proteazo,

- 70% etanol (Nemčija),
- 100% izopropanol (Nemčija),
- avtoklavirana ultra čista voda (aparat ELGA, Purelab Classic, Nemčija),
- delovne raztopine DNA, pripravljene z redčenjem osnovnih izolatov z vodo v razmerju 1:25.

Raztopino encima QIAGEN Proteaze hranimo 2 meseca pri 15-25°C ali pa jo razdeljeno v alikvote ustrezno zamrznemo pri -20°C. S tem zagotovimo optimalno delovanje encima skozi daljše časovno obdobje, pri čemer se izogibamo večkratnemu odmrzovanju in zamrzovanju. Ostale reagentne in pufre za izolacijo DNA hranimo pri temperaturi 15-25°C.

PRIBOR IN APARATURE:

- avtoklavirane plastične epruvetke s pokrovčkom: 0,5 in 1,5mL (Sarstedt, Nemčija),
- 15 ml plastične centrifugirke s pokrovčkom (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija),
- polavtomatske pipete: 0,5-10 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL (Eppendorf, Nemčija),
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra e.p.T.I.P.S.: 10 µL, 200 µL in 1000 µL (Eppendorf, Nemčija),
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija),
- mikrotitrne plošče za 96 vzorcev, MicroAmp® optical 96-Well Reaction Plate (AB Applied Biosystems),
- avtoklav A-21 (Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija); program plastika: 0,1 mPa, 121 , 20 min.,
- centrifuga 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- centrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- vrtinčasto mešalo VORTEX-GENIE2 (Scientific Industries, Florida , ZDA),
- nanodrop ND-1000 Spektrofotometer (NanoDrop, Technologies Inc.),
- hladilnik/zamrzovalnik (Gorenje, Velenje, Slovenija),
- termostatisirana vodna kopel (BIOSAN Wather Bath, WB 4MS),
- plavajoči nosilec,
- brezprašne rokavice Safeeskin PFE (Kimberly-Clark).

3.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času (angl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*) je nadgradnja klasične PCR tehnike, ki temelji na principu sprotnega določanja količine nastajajočega produkta. Metoda združuje hkratno pomnoževanje in detekcijo, kjer na osnovi sproščene fluorescence, ki je sorazmerna količini pomnoženega produkta, kvantificiramo nastali produkt. Slednjega je možno določiti v posameznih ciklih med samim potekom reakcije, kjer na osnovi izmerjene fluorescence v eksponentni fazi reakcije dobimo krivuljo pomnoževanja, ki ponazarja jakost dobljene fluorescence posameznega vzorca v odvisnosti od števila ciklov. Časovno točko oziroma število ciklov, kjer fluorescenca produkta preseže fluorescenco ozadja, imenujemo cikel fluorescenčnega praga (angl. *cycle threshold* - Ct) in je obratnosorazmerna začetni količini tarčne DNA.

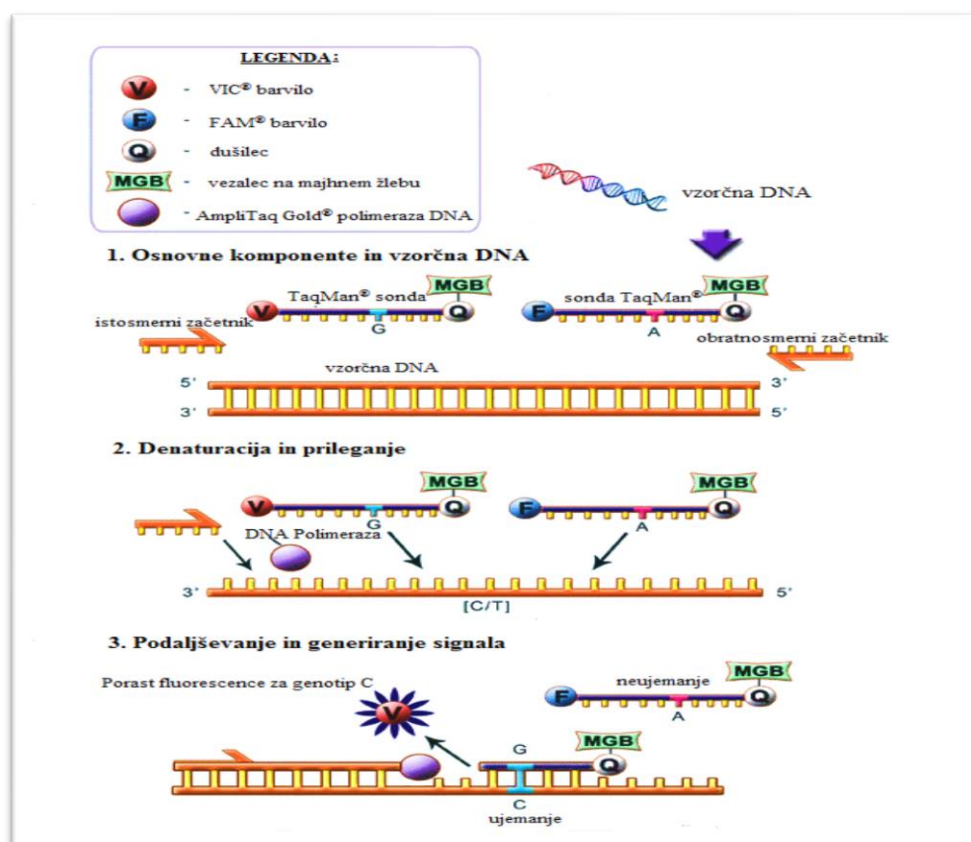
3.3.1 Načini detekcije produktov s PCR v realnem času

Pri nespecifičnih načinih detekcije uporabimo fluorescentna barvila (npr. SYBR® Green I), ki se ne glede na nukleotidno zaporedje vežejo na dvoverižno molekulo DNA. Pri tem oddajajo svetlobo v obliki fluorescence, katere intenziteta sorazmerno narašča s količino prisotne dvoverižne DNA v reakcijski zmesi. Glavna pomanjkljivost in slabost te tehnike je, da se nespecifično barvilo veže na vsako novo nastalo dvoverižno DNA, vključno z dimeri oligonukleotidnih začetnikov. Slednje ima za posledico nastanek fluorescentnega signala, ki je nespecifičen in poveča možnost nastanka lažno pozitivnih rezultatov.

Pri specifičnih načinih detekcije največkrat uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotidne sonde, hibridizacijske ali hidrolizirajoče (TaqMan®) sonde, ki se spicifično vežejo na odsek DNA, ki ga pomnožujemo. Detekcija temelji na procesu prenosa fluorescenčne resonančne energije (angl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer* - FRET) med donorskim in akceptorskim fluoroforom, ki imata prekrivajoče se emisijske in absorpcijske spektre. Pri tem vzbujeno 3'-fluorescentno barvilo prenese energijo na 5'-akceptorsko barvilo, ki posledično odda svetlobo daljše valovne dolžine. Kot akceptorje lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo. Iz te skupine se največkrat uporabljajo hibridizacijske in hidrolizirajoče (TaqMan®) sonde ter molekularna svetila.

3.3.2 Genotipizacija s TaqMan® sondami

V našem primeru smo genotipizacijo vzorcev izvedli s specifično TaqMan® kemijo, kjer smo poleg začetnih oligonukleotidov v reakcijski zmesi uporabili še dvojno označene TaqMan® sonde, specifične za izbrano zaporedje. TaqMan® je hidrolizirajoča sonda s kratkim nukleotidnim zaporedjem, ki ima na 5'-koncu vezan reporterski fluorofor (angl. *reporter*), ki fluorescira, na drugem 3'-koncu pa dušilec (angl. *quencher*), ki fluorescenco preprečuje. Sonda, katere delovanje je specifično in temelji na 5'-eksonukleazni aktivnosti DNA-polimeraze, se v stopnji prileganja komplementarno veže na tarčno zaporedje DNA, med oba začetna oligonukleotida. Dokler sta fluorofora vezana na sondu, zaviralni fluorofor preprečuje fluorescenco reporterskega fluorofora po principu FRET tehnologije in signala reporterske fluorescence ne zaznamo. Tekom reakcije, med podaljševanjem verige DNA, pa 5'-eksonukleazna aktivnost DNA-polimeraze razgradi sondu in s tem loči oba fluorofora. Zaradi njune ločitve se razdalja med njima poveča in reporterski fluorofor začne oddajati fluorescenco, ki jo merimo sproti. Porast fluorescence reporterskega barvila, ki jo v reakcijski zmesi zaznamo, je sorazmerna količini pomnožene DNA (*Slika 2*).



Slika 2: Shematski prikaz poteka reakcije PCR v realnem času s TaqMan® sondo

Za učinkovito genotipizacijo sta potrebni dve TaqMan[®] sondi, ki imata na 5'-koncu vezano reportersko barvilo, in sicer VIC[®] za alel 1 ter FAM[®] za alel 2. Sondi se razlikujeta v enem baznem paru in se vežeta samo na eno varianto alela, ki je lahko mutirana ali nemutirana. Tako je zaporedje ene sonde komplementarno zaporedju za alel 1, zaporedje druge sonde pa zaporedju za alel 2. Z merjenjem porasta intenzitete fluorescence posameznega barvila lahko sklepamo, kateri izmed alelov je prisoten v vzorcu. Če poraste fluorescenca značilna le za zeleno barvilo VIC[®], je oseba homozigot za prvi alel, če poraste fluorescenca samo za modro barvilo FAM[®], pa je oseba homozigot za drugi alel. V primeru porasta fluorescence za obe barvili (rdeče) je oseba heterozigot za oba preiskovana alela.

3.4 Genotipizacija

3.4.1 Pomnoževanje zaporedja tarčne DNA

Tarčne odseke izbranih genov (*ALAD*, *eNOS* in *PEPT2*; *SLC15A2*) smo pomnoževali z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Pri tem je bistveno, da pomnožimo pravi odsek DNA, saj je porast fluorescenčnega signala, ki sledi razpadu sonde in s tem nadaljnja detekcija produktov možna le ob vezavi sonde na ustrezno tarčno zaporedje.

3.4.1.1 Priprava reakcijske zmesi

Ustrezni pogoji dela v laboratoriju, zlasti v prostorih, kjer pripravljamo reakcijsko zmes za PCR, v veliki meri vplivajo na uspešnost izvedbe reakcije pomnoževanja. Reakcijsko zmes, ki je izredno občutljiva na kontaminacijo z DNA iz okolice, smo pripravili v prostorih, kjer je veljal poseben režim čistote. V prostore namenjene izključno delu s PCR reakcijo smo vstopali v čistih delovnih haljah in obvezno uporabljali zaščitne rokavice brez smukca. Pred pričetkom dela smo zagotovili ustrezno čistost delovnih površin PCR komore in vsega pribora, ki smo ga uporabljali. Ves pribor smo pred vnosom v komoro najprej očistili s 3% natrijevim hipokloritom, medtem ko smo plastične epruvetke in nastavke za pipete predhodno še avtoklavirali. Delovno površino PCR komore smo prav tako prebrisali z raztopino 3% natrijevega hipoklorita ali 10% etanolom in jo nato skupaj z očiščenim priborom izpostavili UV svetlobi za najmanj 20 minut. Medtem smo iz hladilnika (4°C) vzeli delovne raztopine DNA in ostale za delo potrebne reagente, ki so bili shranjeni v zamrzovalniku pri -20°C. Pri tem smo pazili, da vzorcev kakor tudi ostalih

reagentov nismo izpostavljali UV svetlobi. Delovne raztopine DNA smo pred uporabo dobro premešali in jih na kratko centrifugirali, da se je vsebina vzorcev zbrala na dnu epruvetke. Enako smo storili z reakcijsko mešanico, ki je vsebovala oligonukleotidne začetnike, TaqMan® Universal PCR Master Mix in dve specifični TaqMan® sondi za genotipizacijo. Reagente, občutljive na svetlobo, smo shranjevali zavite v aluminjsko folijo, pod pogoji, ki jih je navedel proizvajalec. Slednje je veljalo predvsem za mešanico sond in oligonukleotidnih začetnikov, katere smo zaščitene pred neposredno svetlobo hranili v zamrzovalniku pri -20°C. Master Mix smo hranili v hladilniku pri 4°C.

- TaqMan® Genotyping Master Mix (AB Applied Biosystems); sestava:
 - AmpliTaq Gold® DNA polimeraza, ultračista,
 - deoksiribonukleotid trifosfati - dNTPji: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP,
 - pufer z optimizirano sestavo,
 - ROX pasivno referenco, ki služi kot notranja referenca za normalizacijo reporterskega signala med analizo.

Preglednica II: Podatki uporabljenih TaqMan® sond za genotipizacijo.

Sonda	dbSNP ID	Polimorfizem
C_11495146_10	rs1800435	Lys59Asn
C_3219460_20	rs1799983	Asp298Glu
C_385920_30	rs2257212	Leu350Phe
C_7504282_30	rs1143672	Arg509Lys

- TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems):
 - Polimorfizem rs1800435: SNP Genotyping sonda (40x)
Okvir sekvence za ([VIC]/[FAM]):

AGGGCCTCAGCATCTCTTCCAGCCG[C/G]TTCACACCATACCTGTGTGGGTGTG

- Polimorfizem rs1799983: SNP Genotyping sonda (40x)
Okvir sekvence za ([VIC]/[FAM]):

CCCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA[G/T]CCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC
--

- TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay (Applied Biosystems):

- Polimorfizem rs2257212: Drug Metabolism Genotyping sonda (20x)

Okvir sekvence za ([VIC]/[FAM]):

CATGGTGTTACAGGTTCTAAATCCC[C/T]TTCTGGTTCTTATCTTCATCCCGTT

- Polimorfizem rs1143672: Drug Metabolism Genotyping sonda (20x)

Okvir sekvence za ([VIC]/[FAM]):

TTGTAGGTAAAGGATACAGAAAGCA[A/G]AACAACCAATGGGATGACAACCGTG

3.4.1.2 Priprava vzorcev

Za izvedbo genotipizacije smo za vsak polimorfizem pripravili ločeno reakcijsko zmes, ki se je razlikovala v koncentracijski vsebnosti Genotyping Assay Mix-a in nukleotidnem zaporedju alelna specifičnih sond. Za analizo polimorfizmov Lys59Asn gena *ALAD* in Asp298Glu gena *eNOS* smo uporabili SNP Assay Mix 40-kratne koncentracije, medtem ko smo se pri ostalih dveh polimorfizmih (Leu350Phe in Arg509Lys) gena *PEPT2* odločili za Drug Metabolism Assay Mix 20-kratne koncentracije (**Preglednica III**, **Preglednica IV**).

Preglednica III: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo pomnoževanja vzorčne DNA polimorfizmov Lys59Asn gena *ALAD* in Asp298Glu gena *eNOS*.

Komponente za reakcijo	Volumen (μL) za en vzorec
TaqMan® Universal PCR Master Mix	5,26
SNP Genotyping Assay Mix (40x)	0,26
vzorčna DNA	5
celotni volumen zmesi	10,52

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo pomnoževanja vzorčne DNA polimorfizmov Leu350Phe in Arg509Lys gena *PEPT2*.

Komponente za reakcijo	Volumen (μL) za en vzorec
TaqMan® Universal PCR Master Mix	5,56
Drug Metabolism Genotyping Assay Mix (20x)	0,56
vzorčna DNA	5
celotni volumen zmesi	11,12

Za serijo 112 vzorcev smo v PCR delovni komori pripravili skupno reakcijsko zmes z vsemi komponentami, razen vzorčne DNA. Potrebne količine posameznih reagentov (**Preglednica III, Preglednica IV**) smo pomnožili s številom vzorcev in prišteli 10% prebitek, zaradi možnih izgub pri njihovem pipetiranju. Tako pripravljene reakcijske zmesi za posamezen polimorfizem smo v predpisanih količinah nanesli v luknjice na mikrotitrski plošči s kapaciteto 96 vzorcev in nato še v vsako luknjico odpipetirali ustrezen volumen raztopine vzorcev. S pripravo vzorca negativne kontrole, ki smo mu namesto vzorčne DNA dodali avtoklavirano ultra čisto vodo, smo preverili možnost morebitne kontaminacije reagentov. Po končanem pipetiranju smo ploščico z analizo mešanico dobro zaprli, jo natančno prekrili s samolepilno folijo, katere smo se pri tem poskušali čim manj dotikati, ter jo za kratek čas centrifugirali pri 2100 obratih/min, da smo dobili homogeno mešanico.

3.4.1.3 Potek PCR v realnem času

Po centrifugiranju smo mikrotitrsko ploščico s končno zmesjo prenesli do aparata za PCR reakcijo, jo previdno vstavili vanj ter zagnali temperaturni program z optimalnimi pogoji za reakcijo pomnoževanja. Pogoje reakcije z ustreznimi časovnimi intervali in številom ciklov za posamezen polimorfizem prikazujeta **Preglednici V** in **VI**, kjer smo se ravnali po predhodno optimiziranem protokolu, predlaganem s strani proizvajalca reagentov.

Preglednica V: Temperaturna shema PCR reakcije v realnem času za polimorfizma Lys59Asn gena ALAD in Asp298Glu gena eNOS.

Stopnja reakcije	Temperatura (°C)	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	10 min
Denaturacija	92 °C	15 s
Prileganje in izgradnja komplementarne verige DNA	60 °C	60 s  40x

Preglednica VI: Temperaturna shema PCR reakcije v realnem času za polimorfizma Leu350Phe in Arg509Lys gena PEPT2.

Stopnja reakcije	Temperatura (°C)	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	10 min
Denaturacija	92 °C	15 s
Prileganje in izgradnja komplementarne verige DNA	60 °C	60 s  40x

3.4.2 Reagenti in oprema

REAGENTI:

- TaqMan® Genotyping Master Mix (AB Applied Biosystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems); sestava:
 - specifična oligonukleotidna začetnika,
 - dve specifični TaqMan® sonde (en reagenčni komplet za vsak polimorfizem).
- avtoklavirana ultra čista voda (aparat ELGA, Purelab Classic, Nemčija),
- delovne raztopine DNA, pripravljene z redčenjem osnovnih izolatov z vodo v razmerju 1:25.

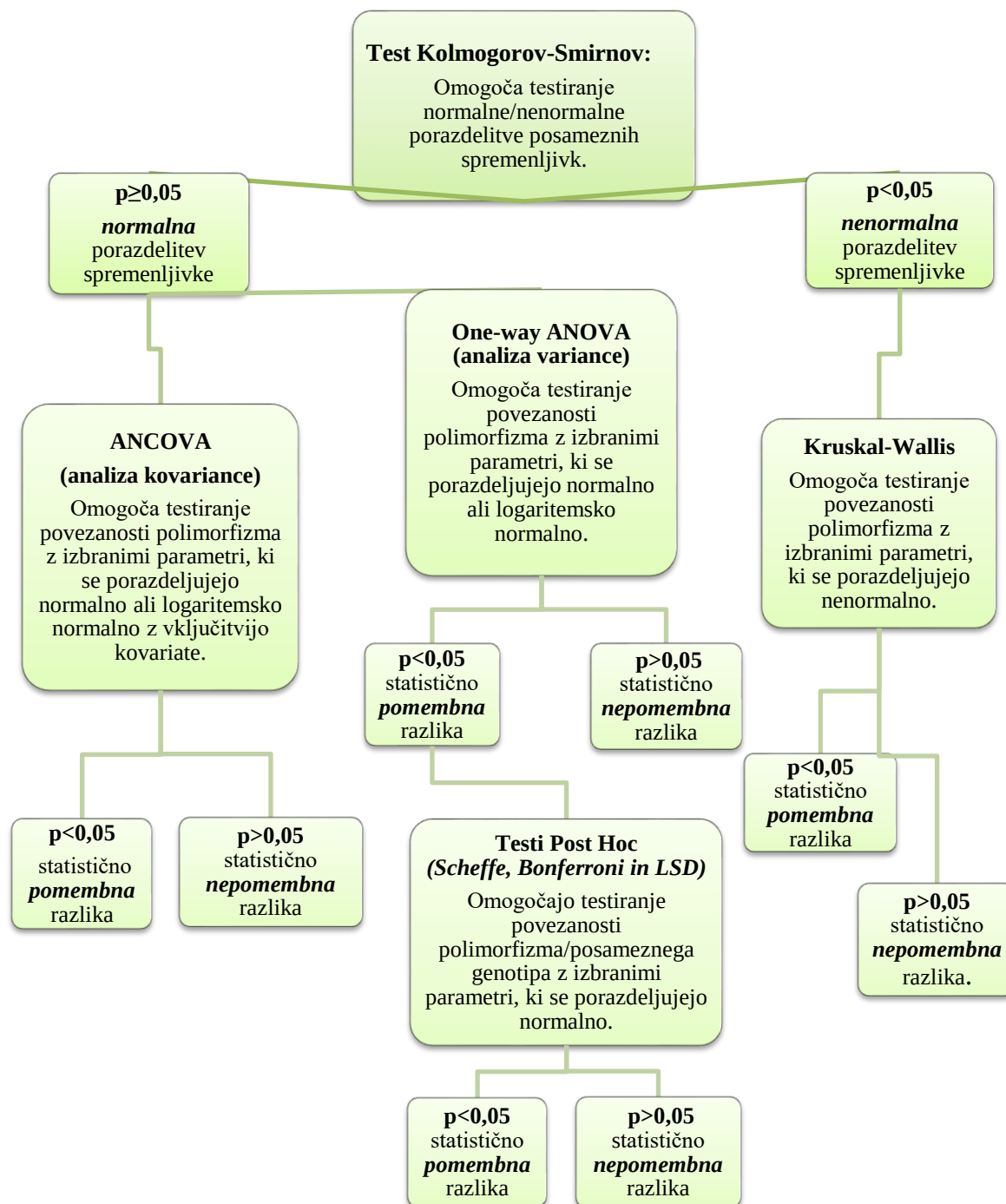
PRIBOR IN APARATURE:

- avtoklavirane plastične epruvetke s pokrovčkom: 0,5 in 1,5mL (Sarstedt, Nemčija),
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL; 2-20 µL; 20-200 µL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete brez filtra e.p.T.I.P.S., 10 µL in 200 µL (Sarstedt, Nemčija),
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija),
- mikrotitrne plošče za 96 vzorcev, MicroAmp® optical 96-Well Reaction Plate (AB Applied Biosystems),
- samolepilna folija za prekrivanje ploščic, Optical Adhesive Film (Micro MicroAmp® Applied Biosystems),
- avtoklav A-21 (Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija),
- delovna komora za PCR (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR),
- vrtinčasto mešalo VORTEX-GENIE2 (Scientific Industries, Florida , ZDA),
- centrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- naprava Real Time PCR LightCycler® 480 II (Roche Applied Science),
- brezprašne rokavice Safeeskin PFE (Kimberly-Clark).

3.5 Statistična analiza

Pridobljene rezultate analize smo statistično ovrednotili s pomočjo računalniškega programa SPSS 17.0 for Windows, proizvajalca SPSS Inc., ZDA.

Pri tem smo uporabljali algoritem statističnih testov, prikazanih na **Sliki 3**:



Slika 3: Prikaz uporabljenih statističnih testov pri stopnji značilnosti $\alpha=0,05$

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Izolacija DNA in njeno vrednotenje

V Zdravstvenem domu Rogaška Slatina smo v obdobju od 2006 do 2009 obravnavali skupino 112 steklobruscev, katerim je bila odvzeta kri in v skladu z navodili proizvajalca reagenta FlexiGene DNA Kit 250 iz levkocitov periferne krvi izolirana genomska DNA. Čeprav so bili nekateri vzorci krvi zelo gosti, se je pri vseh oblikoval stabilen DNA pelet, katerega smo kasneje sprali in posušili na zraku. Sklepali smo, da je bil proces izolacije za vse vzorce uspešen in da smo pri vseh pridobili zadostno količino DNA za nadaljnjo genotipizacijo. To smo potrdili tudi spektrofotometrično na analizatorju NanoDrop® ND-1000, kjer smo z merjenjem absorbance pri 260 nm osnovnim raztopinam DNA določili koncentracijo in nato iz razmerja A_{260}/A_{280} , ki naj bi bilo v območju med 1,8 in 2,0, ocenili čistost izolatov. Izmerjene koncentracije DNA so bile zelo različne in so se gibale med 4,9 ng/ μ L (vzorec št. 79) ter 382,6 ng/ μ L (vzorec št. 103) (**Preglednica XX**). Variirala je tudi čistost teh vzorcev in ni vedno ustrezala priporočenemu razmerju med 1,8 in 2,0.

Heterogenost dobljenih rezultatov je lahko posledica načina vzorčenja in shranjevanja vzorcev pred izolacijo, njihovega staranja in zato nepopolnega raztapljanja vzorčne DNA, prisotnosti nečistot v manjših koncentracijah ter različne vsebnosti in kakovosti izhodne DNA v teh vzorcih. Dopuščamo tudi možnost napak pri odvzemu krvi in sami izvedbi postopka izolacije. Raztopine vseh 112 vzorcev izolirane DNA smo na osnovi izmerjenih koncentracij redčili do približno enakega volumna 50 μ L in nato do končne koncentracije 20 ng/4,75 μ L ter s tem zagotovili optimalne koncentracije genotipizacijske DNA med 3 in 20 ng. Vzorcev z zelo nizko vsebnostjo DNA ob pripravi na genotipizacijo nismo redčili, saj je bila njihova koncentracija že tako nizka.

4.2 Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo v realnem času

Za optimalen potek PCR reakcije smo v cikličnem termostatu *LightCycler® 480 Real Time PCR System II* za izbrane polimorfizme uporabili dva različna programa pomnoževanja, prikazana v **Preglednici V** in **VII**. V primeru prvih dveh polimorfizmov Lys59Asn gena *ALAD* in Asp298Glu gena *eNOS* smo pomnoževanje izvedli s 40 cikli, medtem ko smo število ciklov pomnoževanja pri ostalih dveh polimorfizmih (Leu350Phe in Arg509Lys)

gena *PEPT2* zaradi slabšega pomnoževanja in neuspešnosti posameznih vzorcev iz začetnih 40 povečali na 50. Prav tako je bila stopnja prileganja in izgradnje komplementarne verige DNA v primeru zadnjih dveh polimorfizmov, glede na osnoven program proizvajalca za 30 sekund daljša, s čimer smo še dodatno izboljšali delovne pogoje.

Preglednica V: Temperaturna shema PCR reakcije v realnem času za polimorfizma *Lys59Asn* gena *ALAD* in *Asp298Glu* gena *eNOS*.

Stopnja reakcije	Temperatura (°C)	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	10 min
Denaturacija	92 °C	15 s
Prileganje in izgradnja komplementarne verige DNA	60 °C	60 s  40x

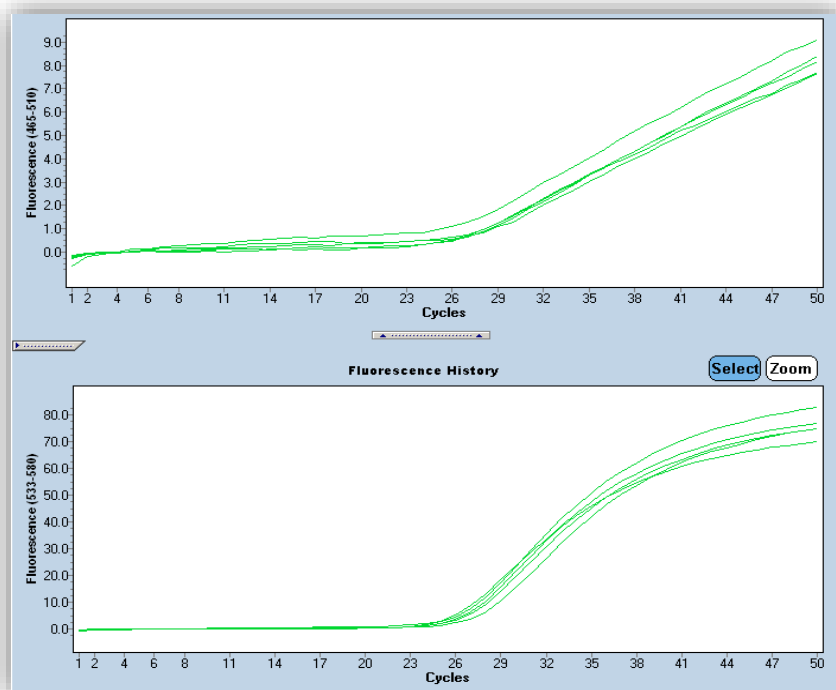
Preglednica VII: Temperaturna shema PCR reakcije v realnem času za polimorfizma *Leu350Phe* in *Arg509Lys* gena *PEPT2* po optimizaciji.

Stopnja reakcije	Temperatura (°C)	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	10 min
Denaturacija	92 °C	15 s
Prileganje in izgradnja komplementarne verige DNA	60 °C	90 s  50x

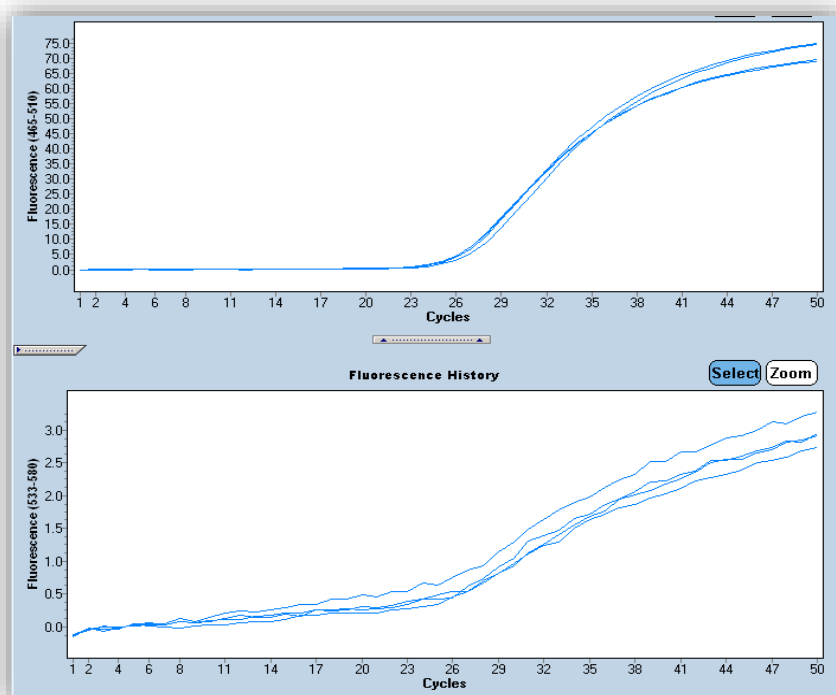
4.3 Razpršeni prikaz rezultatov genotipizacije za izbrane polimorfizme

Na podlagi intenzitete jakosti fluorescence, ki jo sonda odda ob vezavi na ustrezno zaporedje alela, smo po končanem postopku pomnoževanja odčitali dobljene rezultate v obliki grafa in tako našim vzorcem za posamezen polimorfizem določili genotip. Pri tem uporabljeni TaqMan[®] sonde sta z vezavo na zaporedje samo ene variante alela, ki je lahko mutirana ali nemutirana, podali katerega izmed alelov imamo v vzorcu (**Slike 4 - 6**).

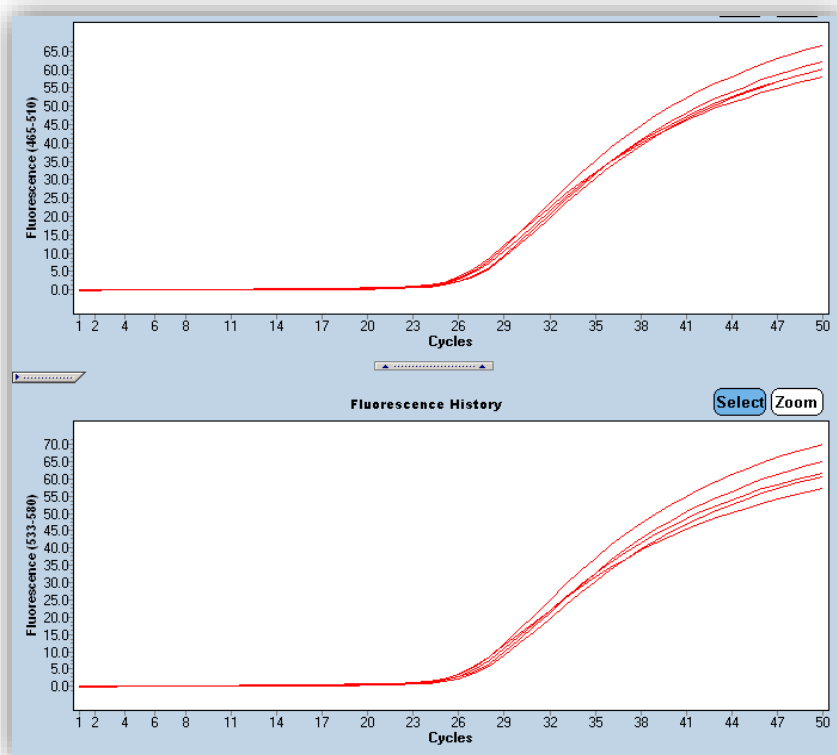
Znaten porast fluorescence, značilne le za barvilo VIC[®] - zelena krivulja (**Slika 4**) pomeni homozigotnost vzorca za prvi alel, porast fluorescence le za barvilo FAM[®] - modra krivulja (**Slika 5**) pa homozigotnost vzorca za drugi alel. Porast fluorescence za obe barvili - rdeča krivulja kaže na heterozigotnost vzorca za oba preiskovana alela (**Slika 6**).



Slika 4: Krivulji fluorescence barvila VIC® pri valovni dolžini 535-580 nm za homozigoten vzorec gena ALAD (Lys59Asn; rs1800305)



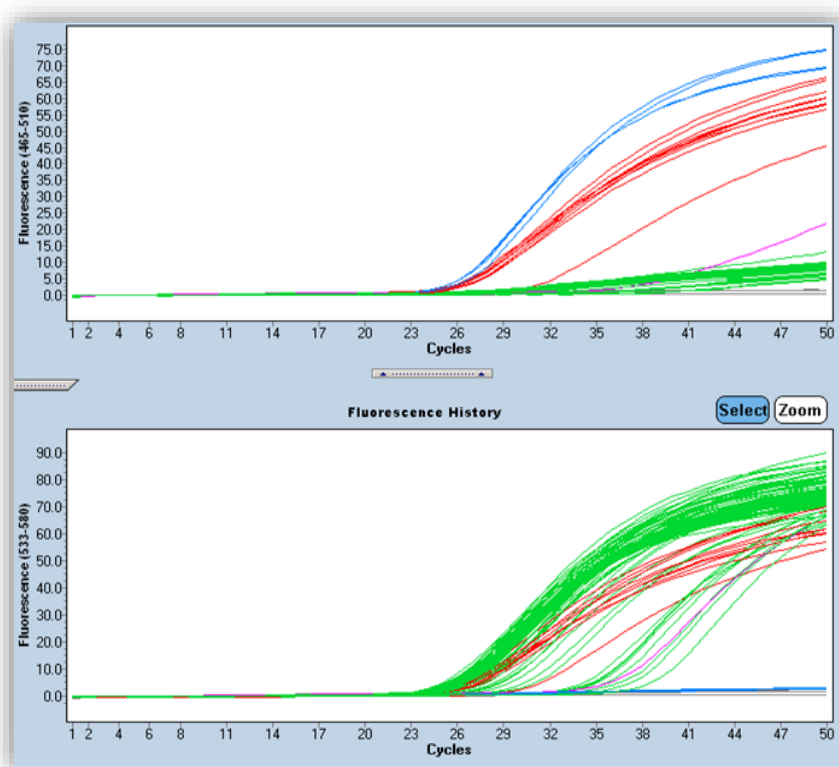
Slika 5: Krivulji fluorescence barvila FAM® pri valovni dolžini 465-510 nm za homozigoten vzorec gena ALAD (Lys59Asn; rs1800305)



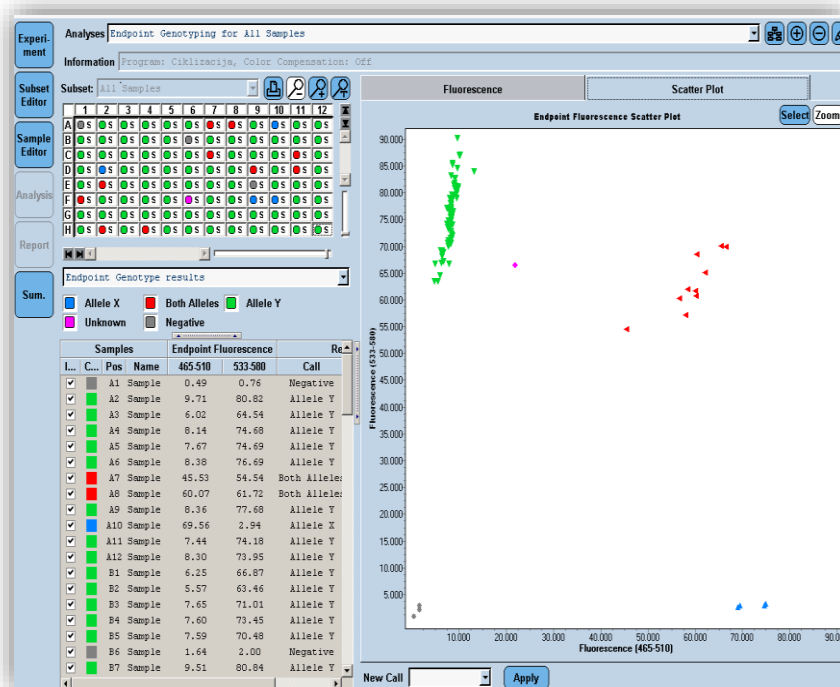
Slika 6: Krivulji fluorescence obeh barvil pri valovni dolžini 535-580nm in 465-510 nm za heterozigoten vzorec gena ALAD (Lys59Asn; rs1800305)

Primer krivulj fluorescence pomnoževanja v odvisnosti od števila ciklov vseh vzorcev hkrati za polimorfizem gena ALAD (Lys59Asn) prikazuje **Slika 7**, kjer sorazmerno s količino pomnožene DNA narašča tudi količina fluorescenčne svetlobe. Na osnovi izmerjene fluorescence pomnožene DNA smo tako za vsak vzorec posebej odčitali količino nastalega produkta v posameznem ciklu verižne reakcije PCR.

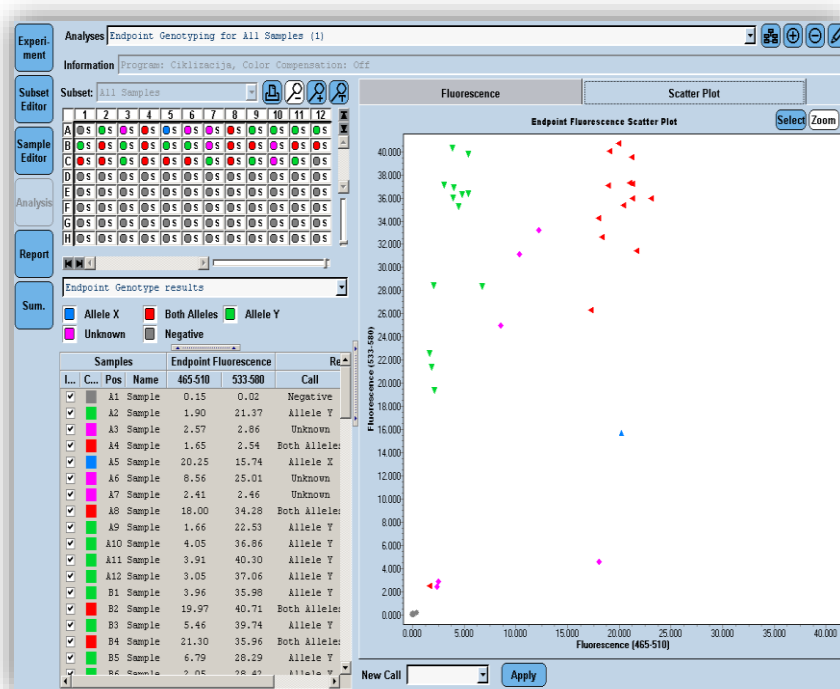
Razpršeni prikaz rezultatov genotipizacije vzorcev s TaqMan® sondami za analizirane polimorfizme prikazujejo **Slike 8, 9 in 10**.



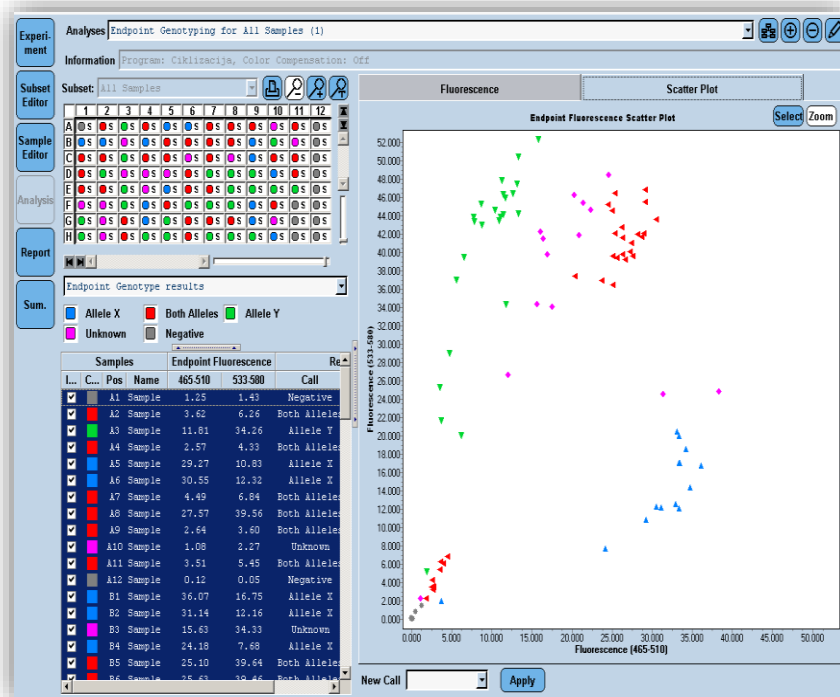
Slika 7: Krivulje fluorescence pomnoževanja vseh vzorcev gena ALAD (Lys59Asn; rs1800305)



Slika 8: Razpršeni prikaz rezultatov končne genotipizacije gena ALAD (Lys59Asn; rs1800305). Zelena VIC® - genotip GG, modra FAM® - genotip CC, rdeča - genotip CG, roza - neopredeljen genotip, siva - neuspeli in vzorec negativne kontrole.



Slika 9: Razpršeni prikaz rezultatov končne genotipizacije gena *eNOS* (*Asp298Glu*; rs1799983). Zelena VIC® - genotip GG, modra FAM® - genotip TT, rdeča - genotip GT, roza - neopredeljen genotip, siva - neuspeli in vzorec negativne kontrole.



Slika 10: Razpršeni prikaz rezultatov končne genotipizacije gena *PEPT2* (*Leu350Phe*; rs2257212). Zelena VIC® - genotip CC, modra FAM® - genotip TT, rdeča - genotip CT, roza - neopredeljen genotip, siva - neuspeli in vzorec negativne kontrole.

Analiza vseh štirih polimorfizmov je potekala po enakem principu. Za v prvem poskusu neuspele vzorce št. **46, 88 in 81** v primeru polimorfizma Lys59Asn, vzorce št. **7, 30, 46, 63, 75 in 94** v primeru polimorfizma Asp298Glu ter vzorce št. **1, 8, 15, 16, 22, 35, 59, 64, 66, 78, 92, 99, 109, 110 in 95** v primeru polimorfizmov Leu350Phe in Arg509Lys, kjer ni bilo zaznati fluorescenčnega signala, smo postopek genotipizacije ponovili. Domnevamo, da je bila količina DNA v teh vzorcih prenizka, možne pa so tudi napake pri pepitiranju in sami izvedbi dela (nezadostno premešana reakcijska mešanica in s tem njena homogenost, hitrost centrifugiranja, prisotnost vzorca na stenah epruvetk, itd). Za vse te vzorce smo reakcijo izvedli pri enakih pogojih, naredili smo le manjšo modifikacijo in na reakcijsko ploščico nanесли nekoliko večji volumen raztopine DNA, kar se je izkazalo za uspešno. Vzorce, kjer nismo bili prepričani o pravilnosti določenih genotipov, smo ponovno genotipizirali in potrdili enake genotipe.

4.4 Genotipske frekvence in pogostnost izbranih polimorfizmov

Pred statistično analizo rezultatov vseh 112 uspešno pomnoženih vzorcev DNA smo preučevani populaciji slovenskih steklobruscev določili genotipe in pogostnost preučevanih polimorfizmov (**Preglednica VIII**). S pomočjo statistične analize χ^2 (hi-kvadrat) testa smo najprej izračunali P vrednosti in nato preverili ali se dobljene frekvence porazdeljujejo v skladu z zakonom Hardy-Weinbergovega ravnotežja. Končne rezultate genotipizacije analizirane populacije prikazuje **Preglednica XXI** (glej poglavje **7. Priloge**).

Hardy-Weinbergov zakon (angl. *Hardy-Weinberg equilibrium* - HWE) pravi, da je v velikih populacijah, v odsotnosti mutacij, nenaključnega parjenja, migracij in selekcije, razmerje med frekvenco alelov in genotipov med generacijami konstantno. Na splošno velja naslednja enačba: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, kjer p^2 pomeni frekvenco nemutiranih homozigotov, $2pq$ frekvenco heterozigotov in q^2 frekvenco mutiranih homozigotov. V našem primeru dobljene P vrednosti za posamezne polimorfizme presegajo mejno kritično vrednost 0,05:

- $P_{\text{Lys59Asn}} = 0,107$
- $P_{\text{Asp298Glu}} = 0,696$ ter
- $P_{\text{Leu350Phe}} = 0,957$ in $P_{\text{Arg509Lys}} = 0,571$.

To pomeni, da med teoretično pričakovanimi frekvencami genotipov iz enačbe za HWE in eksperimentalno določenimi frekvencami genotipov v naši populaciji ni statistično

značilnih razlik, saj so le-ti prisotni v pričakovanih deležih. Zaključimo lahko, da je preiskovana populacija slovenskih steklobruscev za vse štiri polimorfizme v Hardy-Weinbergovem ravnotežju in s tem klinično reprezentativna za nadaljnje genetske študije.

Preglednica VIII: Število in frekvenca (%) genotipov polimorfizmov Lys59Asn v ALAD, Asp298Glu v eNOS ter Leu350Phe in Arg509Lys v PEPT2 pri slovenskih steklobruscih.

<i>ALAD</i> Lys59Asn	Število GENOTIPOV	Frekvenca GENOTIPOV (%)
GG	89	79,4
CG	19	17,0
CC	4	3,6
Skupaj	112	100
<i>eNOS</i> Asp298Glu	Število GENOTIPOV	Frekvenca GENOTIPOV (%)
GG	51	45,5
GT	52	46,4
TT	9	8,0
Skupaj	112	100
<i>PEPT2</i> Leu350Phe	Število GENOTIPOV	Frekvenca GENOTIPOV (%)
CC	34	30,4
CT	54	48,2
TT	24	21,4
Skupaj	112	100
<i>PEPT2</i> Arg509Lys	Število GENOTIPOV	Frekvenca GENOTIPOV (%)
GG	36	32,1
AG	50	44,6
AA	26	23,2
Skupaj	112	100

4.5 Ocena kliničnega pomena izbranih polimorfizmov v povezavi z dolgotrajno izpostavljenostjo delavcev toksičnim vplivom Pb²⁺

Namen naše študije je bil preveriti, ali polimorfizmi izbranih genov za dehidratazo δ -aminolevulinske kisline (*ALAD*), endotelijsko sintazo dušikovega oksida (*eNOS*) in peptidni transporter 2 (*PEPT2*; *SLC15A2*) vplivajo na koncentracijo Pb²⁺ v krvi delavcev slovenskih steklobruscev v obdobju izpostavljenosti med leti 2006 in 2009, kar v Sloveniji

še ni bilo raziskano, ter tako oceniti njihove morebitne posledice izpostavljenosti. Slednje smo ovrednotili s pomočjo vrednosti biokemijskih kazalcev toksičnosti, kot so koncentracija hemoglobina (Hb), hematokritna vrednost (Ht), eritrocitni protoporfirin (EP) ter eritrocitna aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kisline (ALAD). Pri tem smo za vsakega preiskovanca upoštevali še serumske koncentracije cistatina C, katalitično aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT) in gama-glutamilttransferaze (GGT) ter vrednosti sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka. Glede na vrednosti in resnost vpliva slednjega na zdravje preiskovancev smo le-te razdelili na hipotenzivne (<100/60 mmHg), hipertenzivne (>140/90 mmHg) ter preiskovance z normalnim krvnim tlakom (120/80 mmHg), katerim smo za potrebe statistične analize določili vrednosti 0, 1 in 2. V istem obdobju izpostavljenosti smo na osnovi povprečnih vrednosti Pb^{2+} štiriletnega obdobja določili tudi hitrost upada njihove koncentracije ionov v krvi (dPb 2006_2009). Izpostavljenost delavcev smo spremljali tri leta, tako da imamo za koncentracije Pb^{2+} v krvi in eritrocitno aktivnost encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline opravljene meritve v treh časovnih obdobjih (2006, 2008 in 2009), za ostale biokemijske pokazatelje toksičnosti Pb^{2+} pa meritve v dveh časovnih obdobjih (2007 in 2008).

Klinični pomen analize rezultatov za izbrane polimorfizme smo obdelali s pomočjo deskriptivne statistike in jih ovrednotili s statističnimi metodami oziroma testi, opisanimi v poglavju 3.8. Posamezne spremenljivke v skupini preiskovancev smo najprej testirali za normalnost porazdelitve z neparametričnim Kolmogorov-Smirnov testom, kjer je vrednost $p \geq 0,05$ pomenila normalno in $p < 0,05$ nenormalno porazdelitev. Spremenljivke z nenormalno porazdelitvijo smo logaritmirali in v primeru njihove normalne porazdelitve nadaljevali z uporabo parametričnih testov analize variance (ANOVA), LSD Post Hoc testov ter analize kovariance z vključitvijo izbranih kovariat (ANCOVA), za katere smo smatrali, da bi lahko imeli značilen vpliv na vrednosti koncentracij Pb^{2+} . V kolikor se vrednosti spremenljivk še vedno niso porazdeljevale normalno ($p < 0,05$), smo zanje uporabili neparametrični Kruskal-Wallis test. Opisani zgornji testi ugotavljajo povezanost genotipa s povprečnimi vrednostmi spremenljivk na podoben način, s tem, da ANOVA primerja vrednosti za vsakega izmed treh genotipov, medtem ko Post Hoc primerja le dva.

Klinične značilnosti preiskovane skupine delavcev skupaj s povprečnimi vrednostmi koncentracij Pb^{2+} in ostalimi spremenljivkami v posameznih obdobjih izpostavljenosti svincu prikazuje **Preglednica XXII** (poglavje 7. **Priloge**). V **Preglednicah XXIII, XXVI**,

XXIX in **XXXII** so podane povprečne koncentracije Pb^{2+} in spremenljivk glede na prisotnost določenega genotipa ter rezultati statistične analize vpliva preučevanih polimorfizmov na njihove vrednosti (p) v okviru testa ANOVA.

4.5.1 Vpliv polimorfizma Lys59Asn gena ALAD na koncentracijo in ostale biokemične pokazatelje toksičnosti Pb^{+} v krvi delavcev

4.5.1.1 Vpliv polimorfizma Lys59Asn gena ALAD na koncentracijo Pb^{+} v krvi

Za ugotavljanje povezanosti genotipov polimorfizma gena ALAD s koncentracijo Pb^{2+} v krvi delavcev v obdobjih izpostavljenosti; 2006 (cPb_2006), 2008 (cPb_2008) in 2009 (cPb_2009) smo uporabili parametrične teste ANOVA, LSD Post Hoc ter ANCOVA teste. S Kolmogorov-Smirnov testom smo preverili in potrdili normalnost porazdelitve koncentracij cPb_2006 in cPb_2009 ($p \geq 0,05$), medtem ko so se vrednosti cPb_2008 porazdeljevale logaritemsko normalno. Izračuni povprečnih vrednosti teh (srednja vrednost $\pm$ SD) v krvi glede na posamezne genotipe so podani v **Preglednici IX**, kjer so po meritvah in vrednotenju rezultatov z enosmerno ANOVA s krepkim tiskom označene statistično značilne $p < 0,05$ vrednosti. Neenako število vzorcev (N) pri posameznih vrednostih je posledica nepopolne podanosti podatkov izpostavljenosti preučevane skupine delavcev.

Postavili smo ničelno in njej nasprotno alternativno hipotezo ter potrdili ali zavrnili veljavnost hipoteze statistično značilne povezanosti genotipa polimorfizma Lys59Asn gena ALAD z vrednostmi koncentracije Pb^{2+} v določenem obdobju izpostavljenosti, in sicer:

- H_0 : Med genotipskimi podskupinami polimorfizma Lys59Asn in primerjanimi povprečnimi vrednostmi Pb^{2+} v krvi slovenskih steklobruscih v določenem obdobju izpostavljenosti ni statistično značilnih razlik (**$p > 0,05$**). To pomeni, da genotip preučevanega polimorfizma ne vpliva na vrednosti koncentracije Pb^{2+} v krvi.
- H_1 : Med genotipskimi podskupinami polimorfizma Lys59Asn in primerjanimi povprečnimi vrednostmi Pb^{2+} v krvi slovenskih steklobruscih so v določenem obdobju izpostavljenosti statistično značilne razlike (**$p < 0,05$**). To pomeni, da genotip preučevanega polimorfizma vpliva na vrednosti koncentracije Pb^{2+} v krvi.

Preglednica IX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije Pb^{2+} v krvi delavcev ($\mu g/L$) po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena ALAD, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

ALAD Lys59Asn	$X \pm SD$			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	GG	CG	CC	P	p	
cPb_2006 ($\mu g/L$)	269,92 $\pm$ 91,30 N=83	358,35 $\pm$ 124,51 N=17	247,00 $\pm$ 85,37 N=4	0,003	GG - CG CC - CG	0,001 0,042
IncPb_2008 ($\mu g/L$)	5,189 $\pm$ 0,383 N=85	5,332 $\pm$ 0,387 N=19	5,294 $\pm$ 0,505 N=4	0,325		
cPb_2009 ($\mu g/L$)	185,51 $\pm$ 66,55 N=74	199,93 $\pm$ 59,63 N=14	200,25 $\pm$ 91,08 N=4	0,711		
dPb 2006_2009 ($\mu g/L$)	81,66 $\pm$ 69,29 N=70	150,75 $\pm$ 119,67 N=12	46,75 $\pm$ 38,14 N=4	0,011	GG - CG CC - CG	0,005 0,022

cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009: koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med leti 2006, 2008 in 2009

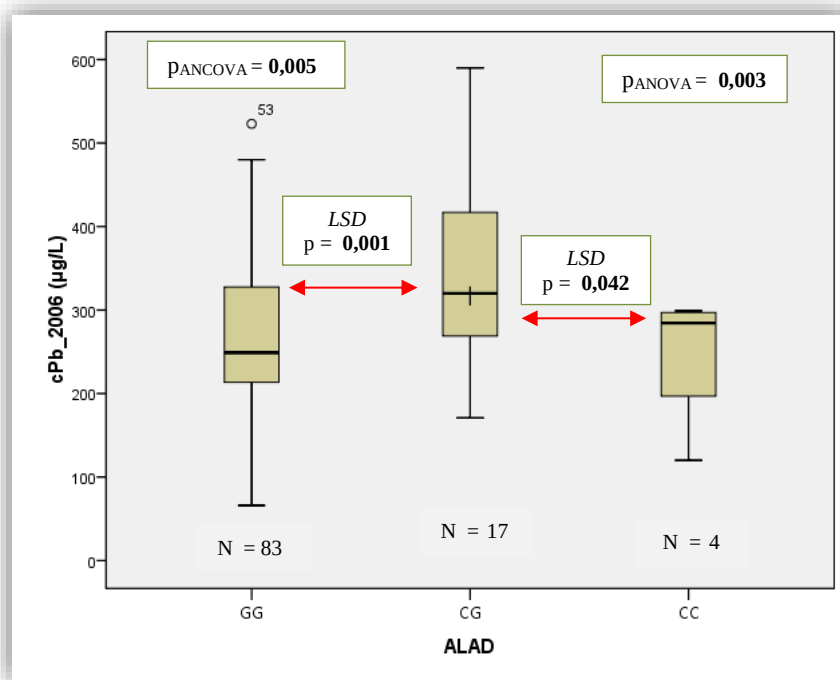
dPb_2006_2009: hitrost upada koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med letoma 2006 in 2009

N = število vzorcev

Iz **Preglednice IX** so razvidne statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih cPb_2006 ($p_{ANOVA}=0,003$) in hitrosti upada njihove koncentracije v krvi med letoma 2006 in 2009 (dPb 2006_2009) ($p_{ANOVA}=0,011$), kar kaže na značilen vpliv preučevanega polimorfizma na Pb^{2+} v krvi slovenskih steklobruscev. Ugotovljeno značilnost cPb_2006 in dPb 2006_2009 smo potrdili z LSD Post Hoc testi, ki nam omogočajo določitev tistih dveh parov podskupin genotipov, katerih povprečne vrednosti preučevanih spremenljivk se med seboj statistično razlikujejo. Dobljene rezultate smo obdelali in nato grafično predstavili z BoxPlot metodo diagramov (»škatla z ročaji«) (**Graf 1, Graf 2**). S testom ANCOVA smo izključili vpliv kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela in delovne dobe na opisane vrednosti preiskovane skupine delavcev ter s tem statistično še dodatno povečali vpliv genotipa nanje.

Iz **Grafa 1** so opazne statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih cPb_2006 preiskovancev med genotipskima podskupinama GG in CG ($p=0,001$) ter CC in CG ($p=0,042$). Najnižje koncentracije so v povprečju izkazovali posamezniki genotipa GG, nekoliko višje posamezniki genotipa CC ter najvišje tisti genotipa CG, kar se ujema z našimi pričakovanji. Iz literature namreč vemo, da bolj elektronegativna varianta encima ALAD pri nosilcih alela C močnejše veže Pb^{2+} , zato je tudi smiselno pričakovati višje koncentracije v krvi, večje telesno breme ter s tem tudi večji rizik za dolgotrajno izpostavljenost pri posameznikih te genotipske podskupine. Da pa bi povečali statistično moč dokazanega vpliva preučevanega polimorfizma na vrednosti cPb_2006, smo se zaradi majhne vzorčne skupine delavcev in zastopanosti posameznikov genotipa CC (N=4),

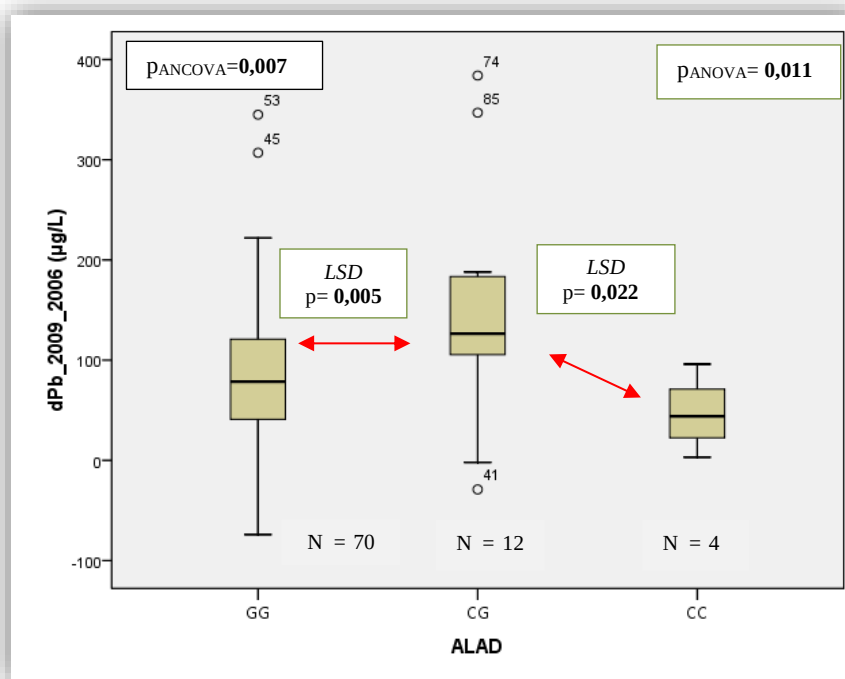
odločili genotipe CG in CC združiti. Dobljeni genotipski podskupini GG in CG+CC smo med seboj primerjali z neodvisnim t-testom (v grafu označen kot t*), kjer je skupina CG+CC izkazovala pričakovano statistično značilne višje vrednosti cPb_2006 glede na tiste genotipa GG (**Graf 24**; poglavje 7. **Priloge**), vendar manjšo statistično moč povezave ob upoštevanju skupnega vpliva preučevanih genotipov.



Graf 1: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije cPb_2006 glede na genotipske podskupine polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).

Kljub statistično neznačilnim povezavam pri lncPb_2008 in cPb_2009, pa lahko iz **Grafa 27** in **28** (poglavje 7. **Priloge**) opazimo podobno gibanje koncentracij Pb^{2+} v krvi delavcev za leti 2008 in 2009 glede na polimorfizem Lys59Asn. Najvišje vrednosti Pb^{2+} so izkazovali preiskovanci z genotipom CC in najnižje tisti z genotipom GG, kar je bilo tudi za pričakovati. Razlog za neznačilne rezultate lahko zopet iščemo v premajhnem številu posameznikov z genotipom CC glede na homozigote GG in heterozigote, zelo verjetno pa je odsotnost povezave posledica prenizke izpostavljenosti (koncentracije Pb^{2+}) delavcev v tem obdobju, kjer izpostavljenost preiskovancev Pb^{2+} ni presegala mejne vrednosti 300 $\mu\text{g/L}$ (**Preglednici IX** in **XXIII**; poglavje 7. **Priloge**). Ob upoštevanju obeh genotipov hkrati so razlike v vrednostih lncPb_2008 in cPb_2009 med preučevanima genotipskima

podskupinama GG in CG+CC ostale statistično neznačilne. Na osnovi rezultatov za cPb_2008 in cPb_2009 lahko torej zaključimo, da se tu naša populacija slovenskih steklobruscev ni statistično značilno razlikovala v koncentracijah Pb^{2+} med posameznimi genotipi in polimorfizem Lys59Asn tako nima značilnega vpliva na njihove vrednosti.



Graf 2: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) padca koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti 2006-2009 glede na genotipske podskupine polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).

Statistično značilne razlike v hitrosti 4-letnega upada koncentracije Pb^{2+} v krvi med letoma 2006 in 2009 (dPb 2006_2009) smo potrdili med genotipskima podskupinama GG in CG ($p=0,005$) ter CC in CG ($p=0,022$) (**Graf 2**). Iz grafa je najvišji padec koncentracije Pb^{2+} opazen med leti 2006 in 2009 pri preiskovancih z genotipom CG ter najmanjši pri preiskovancih z genotipom CC. Možna razlaga je, da slednji, kot posledica višje afinitete in močnejše vezave Pb^{2+} , izkazujejo manjšo količino prostega Pb^{2+} ter s tem pričakovano nižje količine z urinom izločenega DMSA-svinčevega kompleksa. Pri posameznikih te genotipske podskupine to lahko pomeni, da Pb^{2+} ostaja dalj časa v telesu, kar nakazuje na višje koncentracije Pb^{2+} v krvi glede na posameznike z alelom G. Vidimo, da koncentracija Pb^{2+} z letom izpostavljenosti v krvi postopoma upada, verjetno zaradi umika preiskovane skupine delavcev od vira izpostavljenosti. Podatke o dPb 2006_2009 smo imeli le za 86 preiskovancev, zato bi za trdnjše zaključke o dobljenih rezultatih in povečanje statistične

moči našega testa testiranje bilo potrebno izvesti na večjem številu preiskovancev. Smiselno bi bilo tudi opraviti obširnejšo analizo z natančnejšim vpogledom v samo presnovo, transport, shranjevanje ter mehanizem izločanja Pb^{2+} iz telesa.

4.5.1.2 *Vpliv polimorfizma Lys59Asn gena ALAD na pokazatelje toksičnosti Pb^{2+}*

V sklopu naše analize nas je zanimalo tudi, ali obstajajo statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracije ostalih pokazateljev toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev v določenem obdobju izpostavljenosti med posameznimi genotipi polimorfizma Lys59Asn (**Preglednica X**). Pri (logaritemsko) normalno porazdeljenih spremenljivkah (ALAD_2006, lnALAD_2008, ALAD_2009, lnEP_2008, cistatin C_2008, lnALT in lnGGT) smo uporabili parametrični ANOVA, pri nenormalno porazdeljenih spremenljivkah pa neparametrični Kruskal-Wallis test (Ht_2008, sis_krvni_tlak_2008, dia_krvni_tlak_2008). V **Preglednici X** so zaradi boljše preglednosti prikazani samo (mejno) statistično značilni $p < 0,05$ in $0,05 < p < 0,1$ rezultati, označeni s krepkim tiskom.

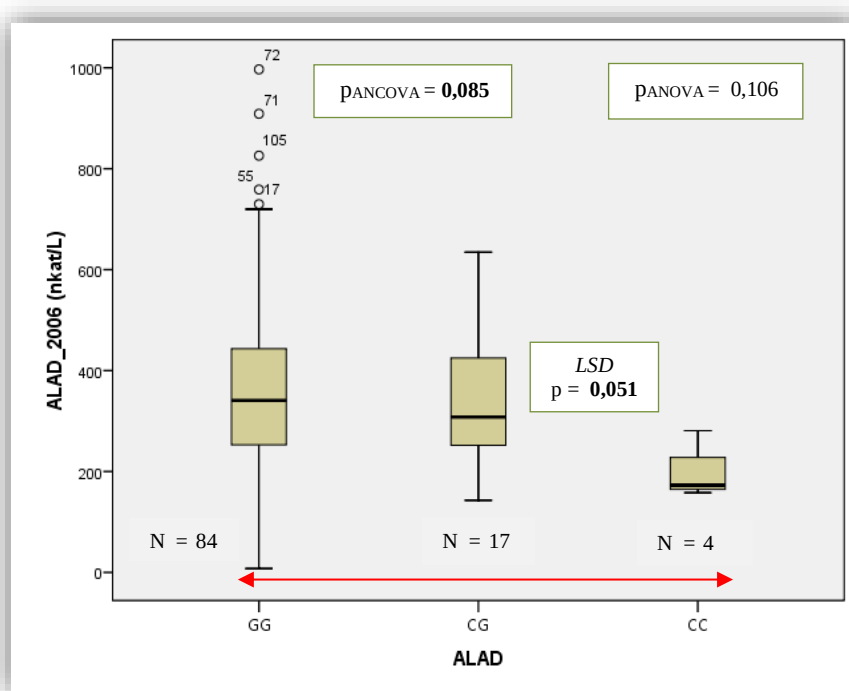
Preglednica X: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pokazateljev toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena ALAD, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

ALAD Lys59Asn	X $\pm$ SD			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	GG	CG	CC	p	p	
ALAD_2006 (nkat/L)	374,25 $\pm$ 185,95 N=84	327,35 $\pm$ 133,17 N=17	196,25 $\pm$ 56,96 N=4	0,106	GG - CC	0,051
lnALAD_2008 (nkat/L)	6,074 $\pm$ 0,421 N=85	5,997 $\pm$ 0,354 N=19	5,702 $\pm$ 0,463 N=4	0,182	GG - CC	0,080
Hb_2008 (g/L)	138,98 $\pm$ 11,58 N=85	144,84 $\pm$ 10,52 N=19	135,75 $\pm$ 10,21 N=4	0,101	GG - CC	0,045

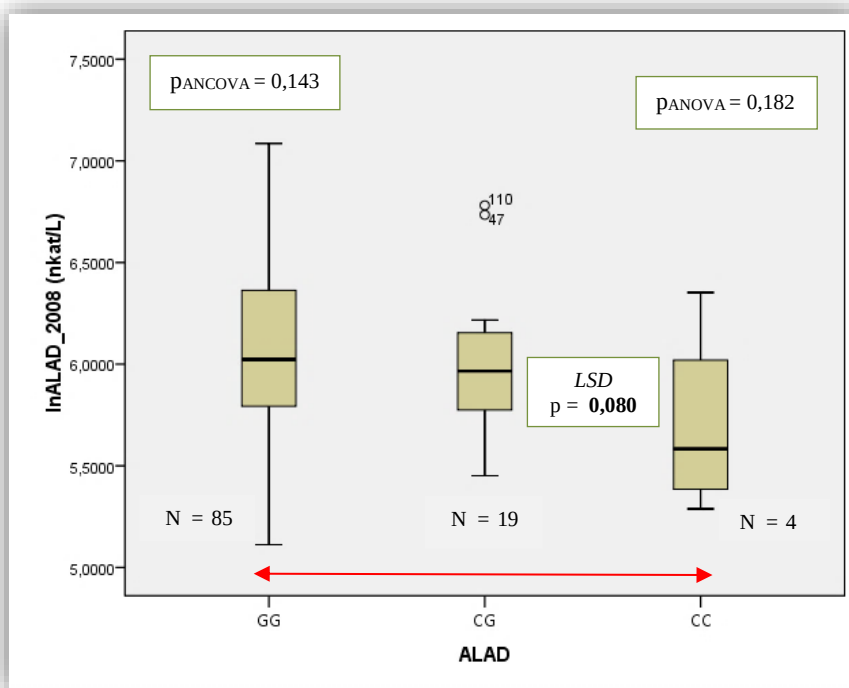
ALAD_2006, lnALAD_2008: aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kisline v letih 2006 in 2008

Hb_2008: koncentracija hemoglobina v letu 2008

S testom ANOVA nismo uspeli dokazati statistično značilnih povezav med povprečnimi vrednostmi opazovanih spremenljivk in genotipi polimorfizma Lys59Asn (**Preglednica X**). Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili (mejno) statistično značilne razlike v aktivnosti encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline za leto 2006 (ALAD_2006; $p=0,051$, **Graf 3**) in 2008 (lnALAD_2008; $p=0,080$, **Graf 4**) ter vrednosti hemoglobina (Hb_2008, $p=0,045$, **Graf 8**) med genotipoma GG in CC. S testom ANCOVA smo izključili vpliv kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela in delovne dobe na vrednosti ALAD_2006 in Hb_2008 preiskovancev ter s tem statistično še dodatno povečali moč vpliva genotipa.



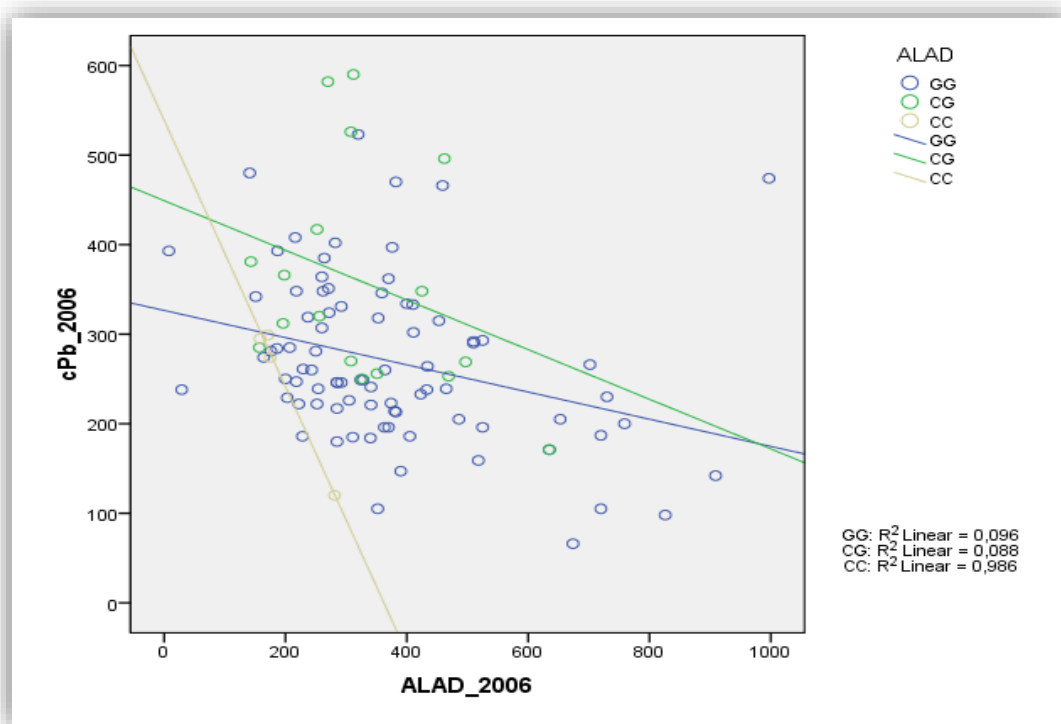
Graf 3: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti ALAD_2006 glede na genotipske podskupine polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).



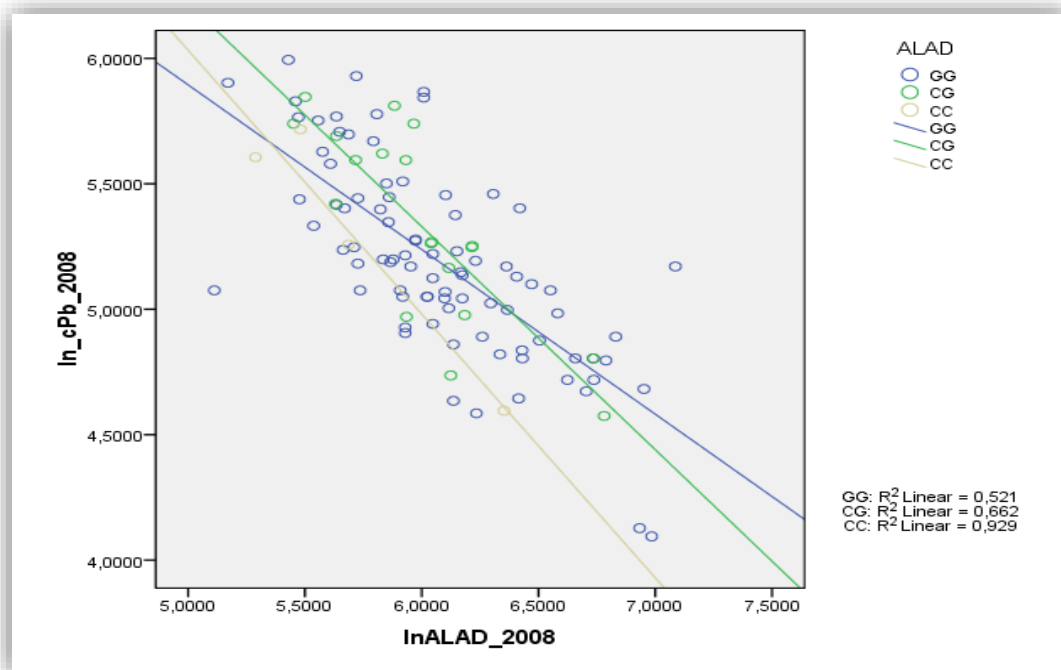
Graf 4: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti lnALAD_2008 glede na genotipske podskupine polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).

Opazili smo mejno statistično značilne razlike v encimski aktivnosti ALAD_2006 in lnALAD_2008, kjer so v obeh primerih v povprečju najvišje vrednosti izkazovali posamezniki z genotipom GG in najnižje tisti z genotipom CC. To kaže na zmanjšano aktivnost encima pri nosilcih alela C, kar bi lahko bilo povezano s pričakovano višjimi koncentracijami Pb^{2+} v krvi, saj vemo, da je aktivnost slednjega obratnosorazmerna z vrednostmi Pb^{2+} . Sklepamo, da genotip CC, ki zagotavlja manj aktivno različico ALAD, močnejše veže Pb^{2+} , kar onemogoči vezavo δ -ALA na ALAD, kot posledica konformacijske spremembe kvarterne strukture proteina. To pomeni, da nižja kot je aktivnost encima, več Pb^{2+} je v krvi in višja sta telesna obremenjenost ter tveganje za njegovo toksičnost. Razlog za mejno statistične rezultate lahko iščemo v nizkih koncentracijah Pb^{2+} v krvi delavcev v tem obdobju izpostavljenosti in številu preiskovancev z določeno aktivnostjo ALAD ter izmerjeno Pb^{2+} v krvi.

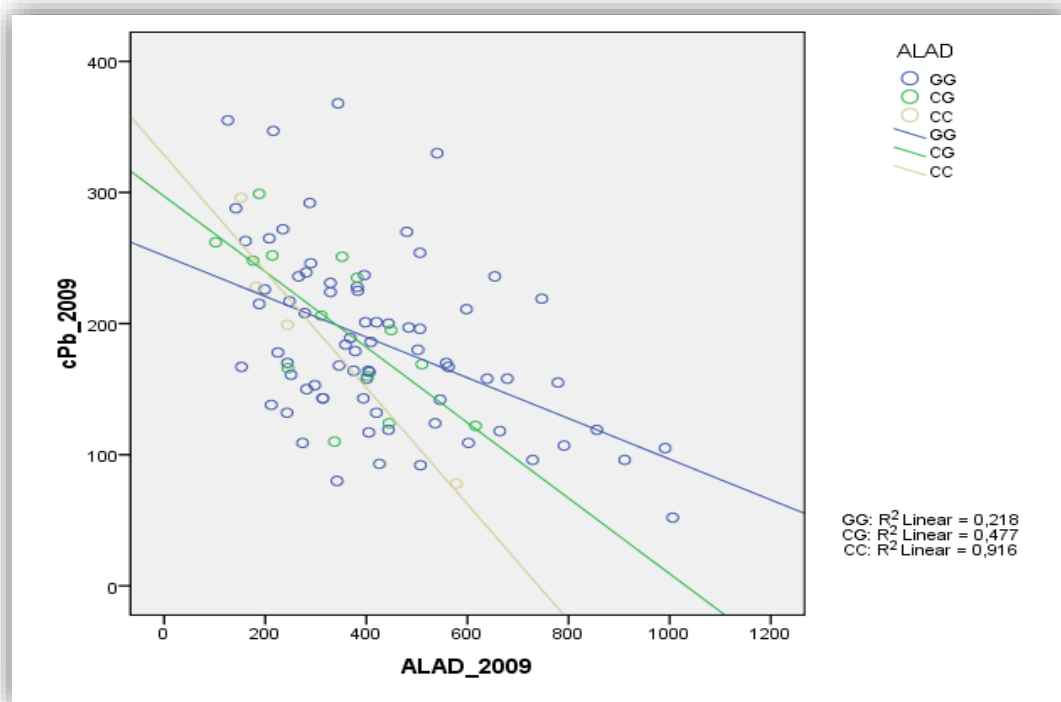
Statistično značilno povezanost med koncentracijami Pb^{+} in encimsko aktivnostjo ALAD v posameznih obdobjih izpostavljenosti med genotipi polimorfizma Lys59Asn smo potrdili s korelacijo po Pearsonu in rezultate tudi grafično prikazali (**Graf 5, 6, 7**).



Graf 5: Rezultati korelacije koncentracij cPb_2006 in encimske aktivnosti ALAD_2006 ($N=104$, $r_p=-0,298$, $p=0,002$).

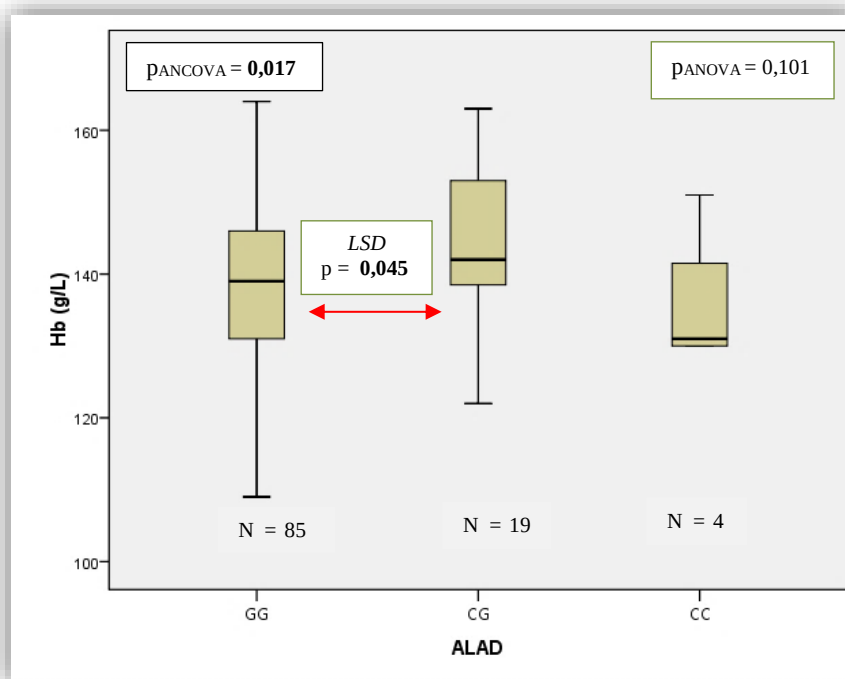


Graf 6: Rezultati korelacije koncentracij $\ln cPb_{2008}$ in encimske aktivnosti $\ln ALAD_{2008}$ ($N=108$, $r_p=-0,740$, $p=0,000$).



Graf 7: Rezultati korelacije koncentracij cPb_{2009} in encimske aktivnosti $ALAD_{2009}$ ($N=92$, $r_p=-0,515$, $p=0,000$).

Iz vseh treh grafov lahko opazimo značilno negativno korelacijo med koncentracijami Pb^{2+} v krvi in aktivnostjo encima ALAD, kjer je najvišja korelacija prisotna med $\ln cPb_{2008}$ in $\ln ALAD_{2008}$ ($r_p = -0,740$, **Graf 6**), nekoliko nižja med cPb_{2009} in $ALAD_{2009}$ ($r_p = -0,515$, **Graf 7**), medtem ko je med cPb_{2006} in $ALAD_{2006}$ korelacija najnižja ($r_p = -0,298$, **Graf 5**). Največji naklon premice grafa posameznih genotipov pri cPb_{2006} in cPb_{2009} opazimo pri genotipu CC, kar pomeni, da je aktivnost ALAD pri tem genotipu najnižja in le-ta najbolj vpliva na porast koncentracij Pb^{2+} v krvi, medtem ko je največji naklon premice pri $\ln cPb_{2008}$ opazen pri genotipu CG.



Graf 8: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije Hb_{2008} glede na genotipske podskupine polimorfizma *Lys59Asn* (ALAD), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).

Statistično značilne razlike v vrednostih Hb_{2008} smo dokazali med genotipskima podskupinama GG in CG, kjer so v povprečju najnižje vrednosti kazali CC posamezniki, verjetno kot posledica najnižje aktivnosti encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline. Prvi klinični znaki zmanjšane nastanka hema se običajno kažejo pri vrednostih Pb^{2+} med 10 in 20 $\mu g/dL$.

4.5.2 Vpliv polimorfizma Asp298Glu gena eNOS na koncentracijo in ostale pokazatelje toksičnosti Pb⁺ v krvi delavcev

4.5.2.1 Vpliv polimorfizma Asp298Glu gena eNOS na koncentracijo Pb²⁺ v krvi

Zanimalo nas je, ali se vrednosti koncentracije Pb²⁺ v krvi delavcev v tem obdobju izpostavljenosti (cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009) statistično značilno razlikujejo tudi glede na genotipe ostalih polimorfizmov, kot je npr. eNOS. Izračuni povprečnih vrednosti le-teh (srednja vrednost ± SD) v krvi in rezultati (mejno) statistično značilnih $p < 0,05$ in $0,05 < p < 0,1$ vrednosti glede na posamezne genotipe so podani v **Preglednici XI**, označeni s krepkim tiskom. Postavili smo ničelno in njej nasprotno alternativno hipotezo ter potrdili ali zavrnili veljavnost hipoteze značilne povezanosti genotipa polimorfizma Asp298Glu gena eNOS z vrednostmi koncentracije Pb²⁺ v določenem obdobju izpostavljenosti.

Preglednica XI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) koncentracije Pb²⁺ v krvi delavcev (μg/L) po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena eNOS, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

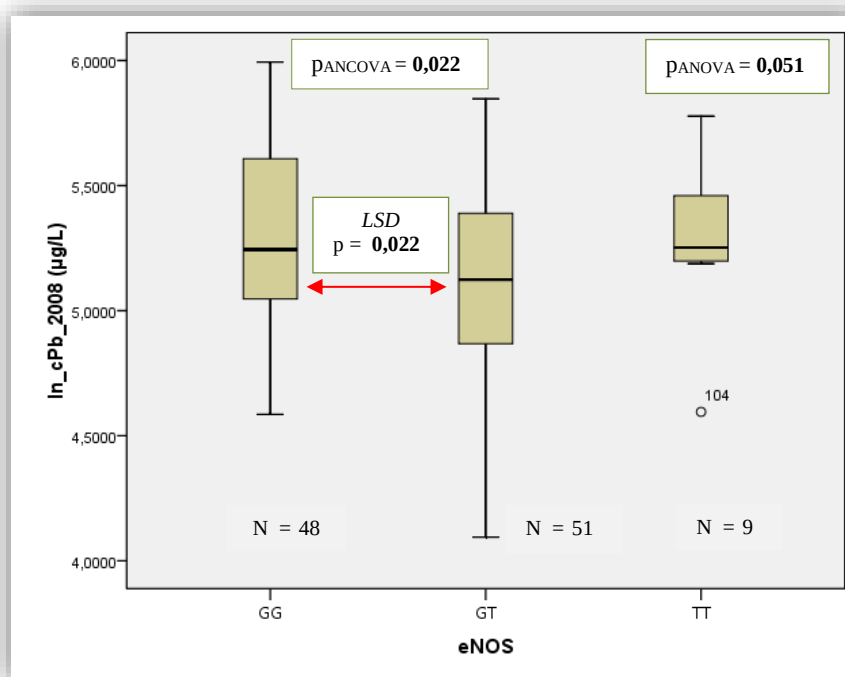
eNOS Asp298Glu	X±SD			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	GG	GT	TT	p	p	
cPb_2006 (μg/L)	284,69±91,41 N=48	276,73±106,65 N=49	322,57±140,1 N=7	0,539		
IncPb_2008 (μg/L)	5,300±0,368 N=48	5,123±0,396 N=51	5,327±0,356 N=9	0,051	GG -GT	0,022
cPb_2009 (μg/L)	203,76±73,90 N=42	171,51±53,99 N=43	199,29±68,47 N=7	0,070	GG -GT	0,024
dPb 2006_2009 (μg/L)	82,90±77,67 N=39	96,27±80,19 N=41	88,67±109,28 N=6	0,763		

cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009: koncentracije Pb²⁺ v obdobju izpostavljenosti med leti 2006, 2008 in 2009

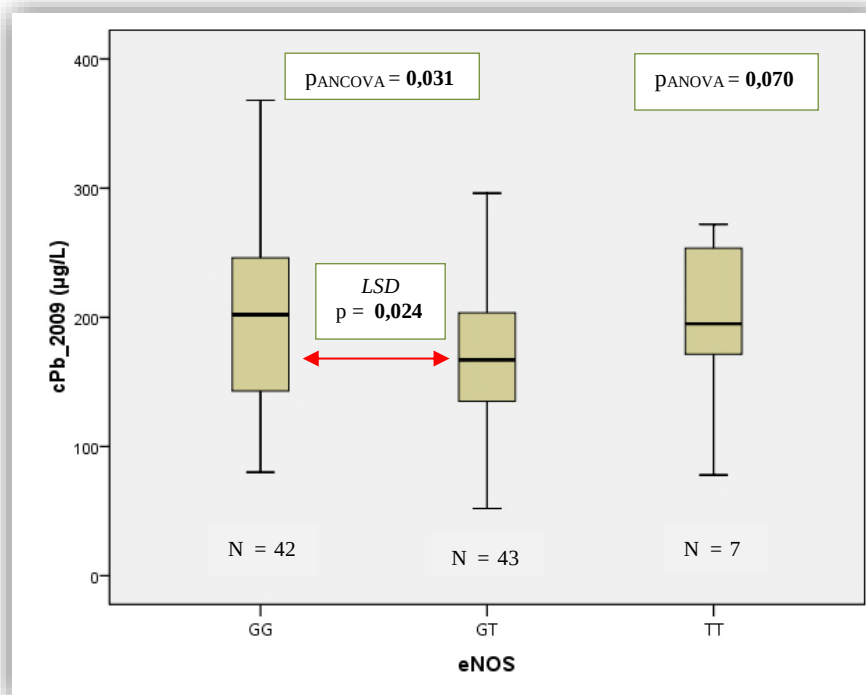
dPb_2006_2009: hitrost upada koncentracije Pb²⁺ v obdobju izpostavljenosti med letoma 2006 in 2009

N = število vzorcev

Iz **Preglednice XI** so razvidne mejno statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih IncPb_2008 ($p_{ANOVA}=0,051$) in cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,070$), kar nakazuje na možen vpliv preučevanega polimorfizma na Pb²⁺ v krvi slovenskih steklobruscev. Za vrednosti cPb_2006 statistično značilne povezanosti med posameznimi genotipi polimorfizma Asp298Glu ni bilo. Dobljeno značilnost IncPb_2008 in cPb_2009 smo potrdili z LSD Post Hoc testi ter rezultate grafično prikazali z BoxPlot metodo diagramov (»škatla z ročaji«) (**Graf 9, Graf 10**). S testom ANCOVA smo izključili vpliv kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela in delovne dobe na te vrednosti preiskovancev ter s tem statistično še dodatno povečali vpliv genotipa nanje.



Graf 9: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije In_cPb_2008 glede na genotipske podskupine polimorfizma Asp298Glu (eNOS), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, TT - mutiran homozigot, GT - heterozigot).



Graf 10: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije cPb_2009 glede na genotipske podskupine polimorfizma Asp298Glu (eNOS), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, TT - mutiran homozigot, GT - heterozigot).

Iz **Grafa 9** in **10** so pri LSD testu opazne značilne razlike v povprečnih vrednostih lncPb_2008 ($p=0,022$) in cPb_2009 ($p=0,024$) preiskovancev med genotipskima podskupinama GG in GT. Najvišje koncentracije so v povprečju izkazovali posamezniki z genotipom GG in najnižje tisti z genotipom GT. Sklepali smo, da prisotnost alela T pripomore k višjim koncentracijam Pb^{2+} v krvi, saj naj bi posamezniki s tem alelom izkazovali večjo občutljivost za proteolitično cepitev encima endotelijske sintaze NO in posledično nižjo bazalno sintezo ter razpoložljivost bioaktivnega NO glede na posameznike z genotipom CC. Zavedati pa se moramo, da je dokazani vpliv polimorfizma Asp298Glu na vrednosti cPb_2008 in cPb_2009 omejen zaradi premajhne velikosti vzorca in števila posameznikov z genotipom TT ($N=7$) glede na homozigote GG in heterozigote.

Koncentracijski profil Pb^{2+} v krvi za lncPb_2008 in cPb_2009 (**Graf 25** in **26**; poglavje 7. **Priloge**) je ob združitvi genotipov GT in TT primerljiv s koncentracijskim profilom **Grafa 10**, kjer v povprečju najvišje vrednosti izkazujejo posamezniki genotipa GG in najnižje tisti genotipa GT+TT. Pri lncPb_2008 je povezava še vedno mejno statistično značilna, medtem ko pri cPb_2009 ob združitvi genotipov le-ta postane statistično značilna.

Pri cPb_2006 statistično značilne povezanosti med polimorfizmom in koncentracijami Pb^{2+} ni bilo opaziti, kljub temu, da so bile vrednosti Pb^{2+} preiskovancev s TT genotipom v povprečju višje kot pri nosilcih alela G in nad mejno vrednostjo $\geq 300 \mu\text{g/L}$. Zelo verjetno obstajajo tudi drugi, nam še neznani mehanizmi delovanja tega polimorfizma na koncentracije Pb^{2+} , zato bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno preučiti tako ostale SNP-je eNOS gena, kot tudi nekatere druge gene, npr. antioksidantnih encimov GSH, SOD in CAT, na katere bi lahko Pb^{2+} preko vezave na -SH skupine imel vpliv. Zanimivo bi bilo preučiti tudi povezanost polimorfizma Asp298Gu z razlikami v koncentraciji Pb^{2+} v trabekularni kosti in njihovo morebitno korelacijo z zmanjšanim nastajanjem in razpoložljivostjo biološko aktivnega NO ter s tem zvišanim tveganjem za razvoj arterijske hipertenzije. Zaključimo lahko, da se tu naša populacija slovenskih steklobruscev statistično značilno ne razlikuje v koncentracijah Pb^{2+} med posameznimi genotipi preučevanega polimorfizma Asp298Glu.

4.5.2.2 Vpliv polimorfizma Asp298Glu gena eNOS na pokazatelje toksičnosti Pb⁺

Za vrednotenje razlik v povprečnih vrednostih koncentracij ostalih pokazateljev toksičnosti Pb⁺ v krvi delavcev v določenem obdobju izpostavljenosti med posameznimi genotipi polimorfizma Asp298Glu smo glede na normalnost porazdelitve spremenljivk uporabili enake teste kot pri polimorfizmu Lys59Asn (**Preglednica XII**). Zaradi boljše preglednosti so prikazani samo mejno statistično značilni rezultati $0,05 < p < 0$, označeni krepko.

Preglednica XII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pokazateljev toksičnosti Pb⁺ v krvi delavcev po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena eNOS, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

eNOS Asp298Glu	X $\pm$ SD			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	GG	GT	TT	p	p	
ALAD_2006 (nkat/L)	330,10 $\pm$ 171,17 N=48	393,64 $\pm$ 189,18 N=50	322,86 $\pm$ 104,96 N=7	0,180	GG - GT	0,079
ALAD_2009 (nkat/L)	368,60 $\pm$ 162,22 N=42	441,14 $\pm$ 228,96 N=43	435,14 $\pm$ 107,64 N=7	0,135	GG - GT	0,088
cistatin C_2008 (mg/L)	0,684 $\pm$ 0,065 N=48	0,659 $\pm$ 0,068 N=51	0,672 $\pm$ 0,065 N=9	0,175	GG - GT	0,063

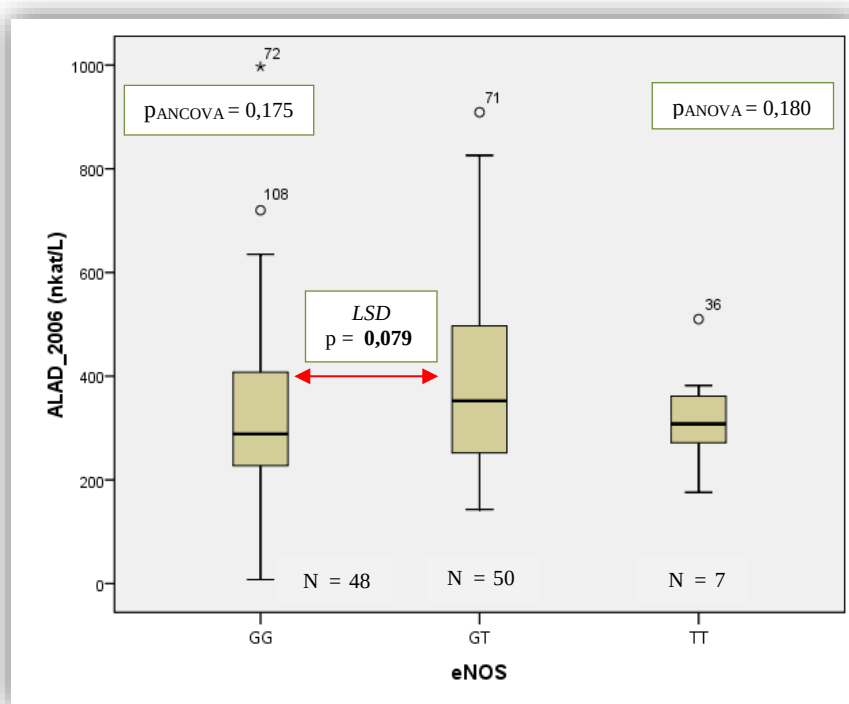
ALAD_2006, ALAD_2009: aktivnost dehidrataze δ -aminolevulinske kisline v letih 2006 in 2009

cistatin C_2008: koncentracija serumskega cistatina C v letu 2008

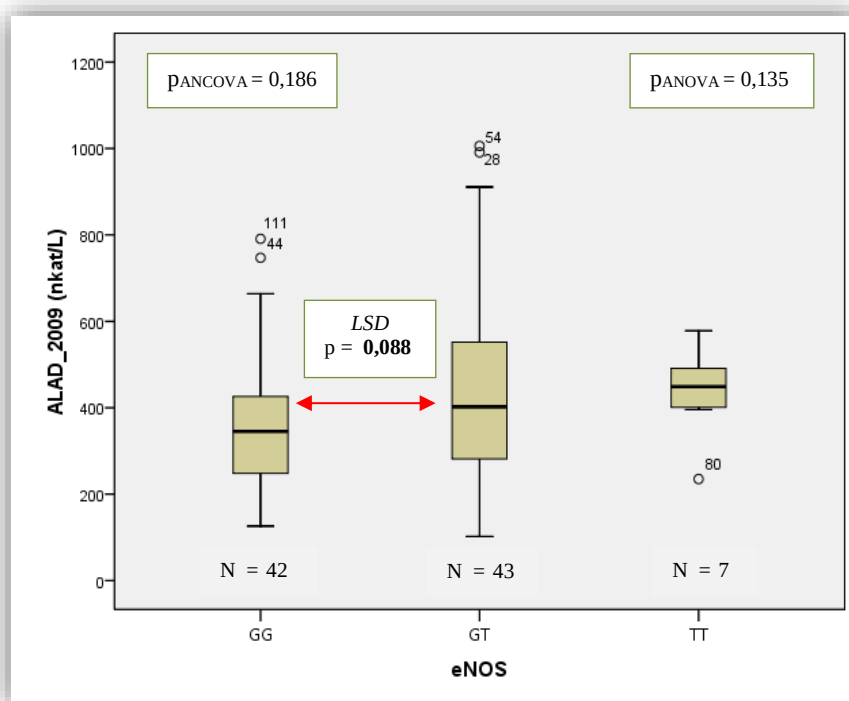
N=število vzorcev

S testom ANOVA nismo uspeli dokazati statistično značilnih povezav med povprečnimi vrednostmi opazovanih spremenljivk in genotipi polimorfizma Asp298Glu (**Preglednica XII**). Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili mejno statistično značilne razlike v aktivnosti encima dehidrataze δ -aminolevulinske kisline za leto 2006 (ALAD_2006, $p=0,079$, **Graf 11**) in 2009 (ALAD_2009, $p=0,088$, **Graf 12**) ter vrednosti cistatina C_2008 ($p=0,063$) med genotipskima podskupinama GG in GT. S testom ANCOVA vpliva kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela in delovne dobe na opisane vrednosti preiskovancev nismo mogli izključiti, zaradi česar je tudi vpliv genotipa nanje manjši.

Statistično značilne razlike v serumskih vrednostih cistatina C_2008 smo dokazali med genotipskima podskupinama GG in GT, kjer so v povprečju najvišje vrednosti dosegali TT posamezniki, nekoliko nižje GG in najnižje GT posamezniki. Najnižje vrednosti smo dokazali pri nosilcih alela G, kar naj bi sicer pomenilo tudi nižje tveganje za kardiovaskularne bolezni in boljšo ledvično funkcijo pri teh. Izmerjene vrednosti tlaka in serumskega cistatina C so bile znotraj meja referenčnih vrednosti.



Graf 11: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti ALAD_2006 glede na genotipske podskupine polimorfizma Asp298Glu (eNOS), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, TT - mutiran homozigot, GT - heterozigot).



Graf 12: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti ALAD_2009 glede na genotipske podskupine polimorfizma Asp298Glu (eNOS), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, TT - mutiran homozigot, GT - heterozigot).

Dokazali smo mejno statistično značilne razlike v encimski aktivnosti ALAD_2006 in ALAD_2009, kjer so v obeh primerih najnižje vrednosti izkazovali posamezniki genotipa GG in najvišje posamezniki genotipa GT (ALAD_2006) ter genotipa TT (ALAD_2009). Dobljeni rezultati pri ALAD_2009 so v skladu s pričakovanim, saj so najvišje povprečne vrednosti cPb_2009 dosegali ravno posamezniki genotipa GG. Manjša aktivnost ALAD naj bi bila sicer povezana z višjimi koncentracijami Pb^{2+} v krvi, vendar v razpoložljivi literaturi nismo našli, da bi bila aktivnost omenjenega encima preučevana v povezavi s polimorfizmom Asp298Glu. Rezultate bi bilo smiselno potrditi na večjem številu preiskovancev, zanimivo pa bi bilo preučiti vpliv Pb^{2+} tudi na ekspresijo in aktivnost eNOS

4.5.3 Vpliv polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg509Lys* gena *PEPT2* na koncentracijo in ostale pokazatelje toksičnosti Pb^{+} v krvi delavcev

4.5.3.1 Vpliv polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg 509Lys* gena *PEPT2* na koncentracijo Pb^{+} v krvi

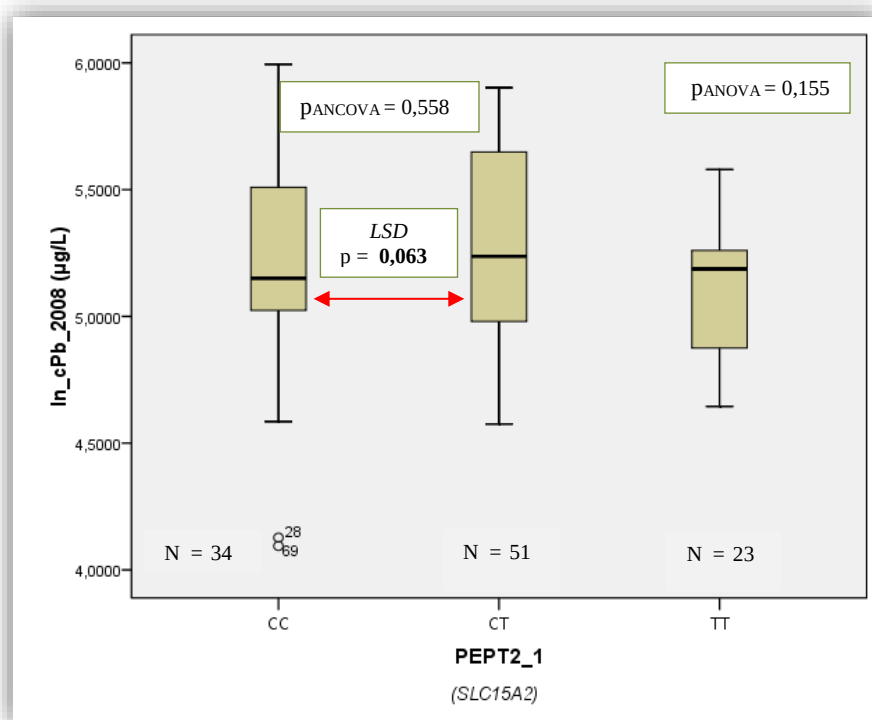
Za vrednotenje povezanosti koncentracije Pb^{2+} v krvi delavcev v teh treh letih izpostavljenosti (cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009) glede na genotipe polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg509Lys* gena *PEPT2* smo ponovno uporabili parametrične ANOVA, LSD Post Hoc ter ANCOVA teste. Izračuni povprečnih vrednosti le-teh (srednja vrednost $\pm$ SD) v krvi in rezultati (mejno) statistično značilnih $p < 0,05$ in $0,05 < p < 0,1$ vrednosti glede na posamezne genotipe so podani v **Preglednicah XIII** in **XIV**, označeni s krepkim tiskom.

Preglednica XIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije Pb^{2+} v krvi delavcev ($\mu g/L$) po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena *PEPT2*, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

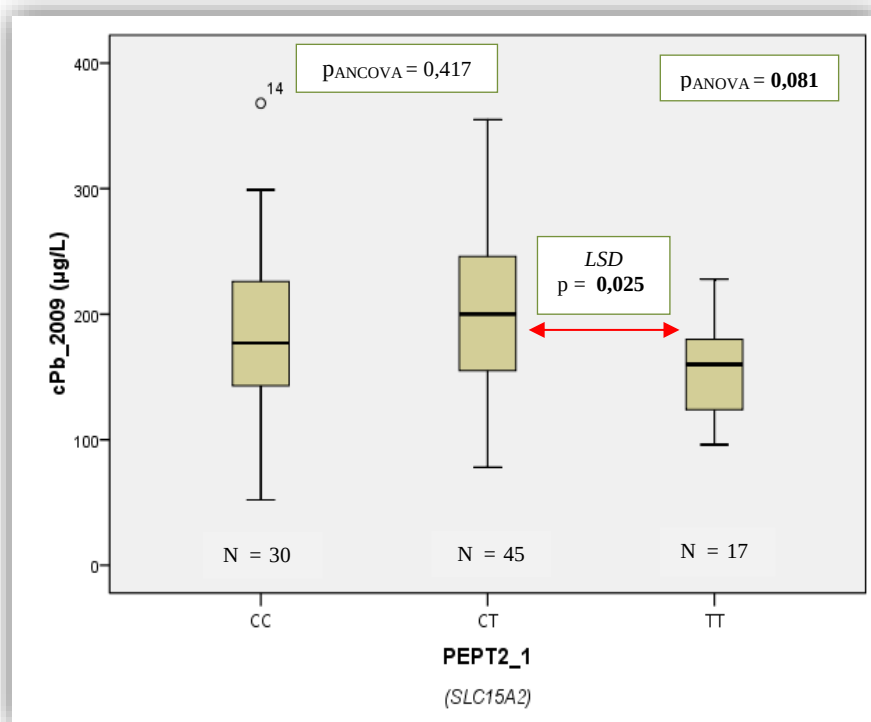
<i>PEPT2</i> Leu350Phe	<i>X</i> $\pm$ SD			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	CC	CT	TT	p	p	
cPb_2006 ($\mu g/L$)	280,94 $\pm$ 93,39 N=33	296,73 $\pm$ 105,16 N=51	253,95 $\pm$ 105,3 N=20	0,280		
IncPb_2008 ($\mu g/L$)	5,190 $\pm$ 0,449 N=34	5,288 $\pm$ 0,384 N=51	5,106 $\pm$ 0,264 N=23	0,155	TT – CT	0,063
cPb_2009 ($\mu g/L$)	187,40 $\pm$ 69,23 N=30	200,33 $\pm$ 68,98 N=45	158,29 $\pm$ 41,30 N=17	0,081	TT – CT	0,025
dPb 2006_2009 ($\mu g/L$)	89,55 $\pm$ 81,81 N=29	90,95 $\pm$ 79,47 N=42	86,33 $\pm$ 85,86 N=15	0,982		

cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009: koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med leti 2006, 2008 in 2009
dPb_2006_2009: hitrost upada koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med letoma 2006 in 2009

Iz **Preglednice XIII** je razvidna mejno statistično značilna razlika v povprečnih vrednostih cPb_2009 ($p_{\text{ANOVA}}=0,081$), kar nakazuje na možen vpliv preučevanega polimorfizma na Pb^{2+} v krvi slovenskih steklobruscev. S testom ANOVA nismo uspeli dokazati značilnih povezav med povprečnimi vrednostmi cPb_2006, zato lahko zaključimo, da se tu naša populacija steklobruscev ni statistično značilno razlikovala v koncentracijah Pb^{2+} med posameznimi genotipi polimorfizma Leu350Phe. Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili mejno statistično značilne razlike v vrednostih lncPb_2008 ($p=0,063$, **Graf 13**) in potrdili dobljeno značilnost cPb_2009 ($p=0,025$, **Graf 14**) med genotipskima podskupinama TT in CT ter rezultate grafično prikazali z BoxPlot metodo diagramov (»škatla z ročaji«). Najvišje povprečne vrednosti lncPb_2008 in cPb_2009 so izkazovali posamezniki z genotipom CT in najnižje posamezniki z genotipom TT. S testom ANCOVA vpliva kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela in delovne dobe na opisane vrednosti preiskovancev nismo mogli izključiti, tako je tudi vpliv genotipa nanje statistično manjši.



Graf 13: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije lncPb_2008 glede na genotipske podskupine polimorfizma Leu350Phe (PEPT2_1), v okviru LSD Post Hoc testa (CC - nemutiran homozigot, TT - mutiran homozigot, CT - heterozigot).



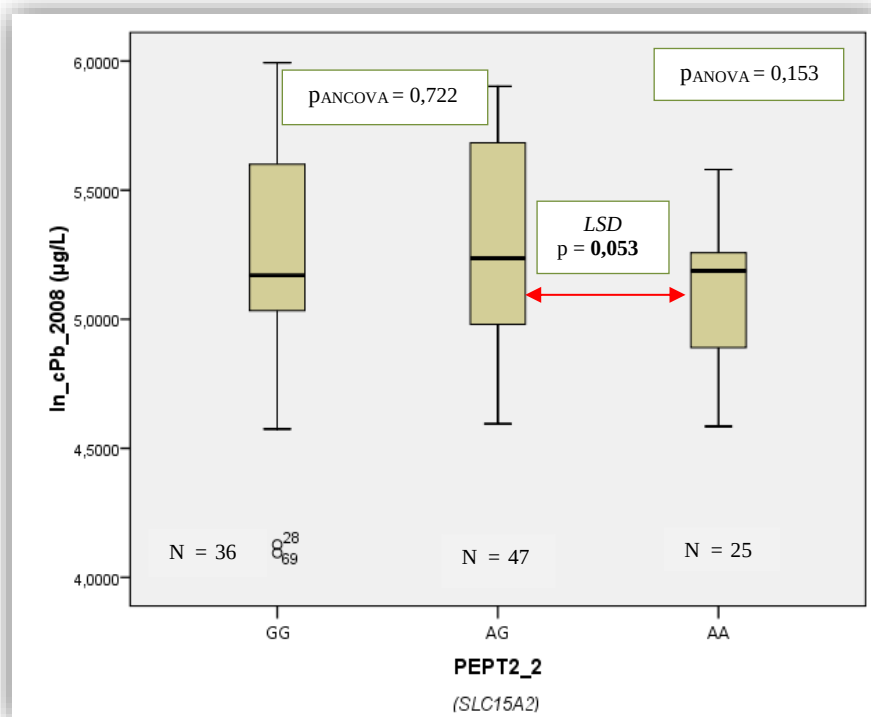
Graf 14: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije cPb_2009 glede na genotipske podskupine polimorfizma Leu350Phe (PEPT2_1), v okviru testa ANOVA (CC - nemutiran homozigot, TT - mutiran homozigot, CT - heterozigot).

Tako, kot smo to naredili za polimorfizem Leu350Phe gena *PEPT2*, smo tudi za polimorfizem Arg509Lys istega gena postavili ničelno in njej nasprotno alternativno hipotezo ter potrdili ali zavrnili veljavnost hipoteze statistično značilne povezanosti genotipa z vrednostmi koncentracije Pb^{2+} v določenem obdobju izpostavljenosti.

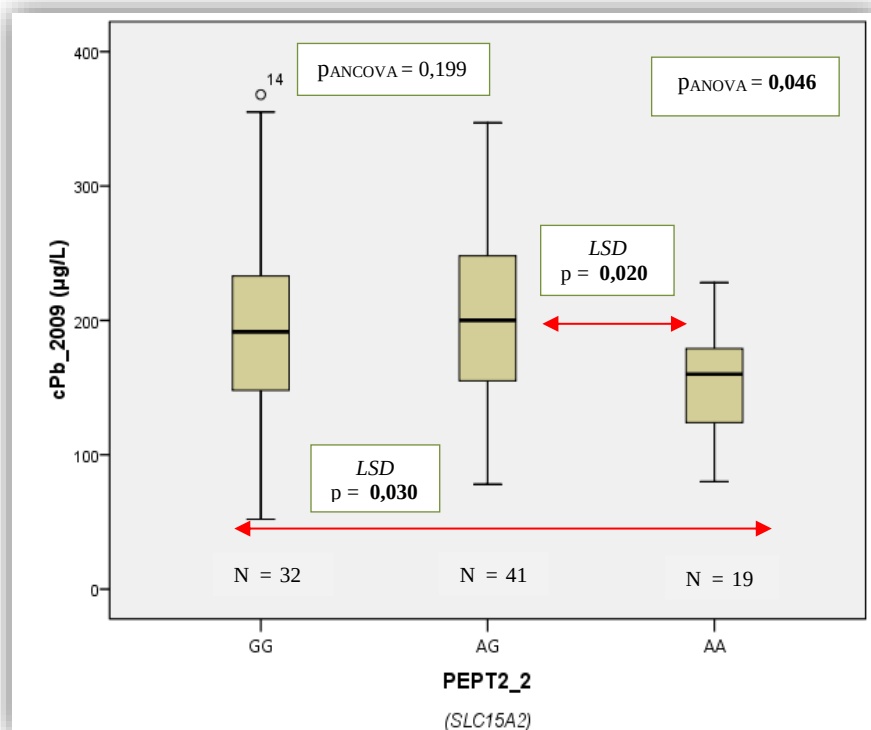
Preglednica XIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije Pb^{2+} v krvi delavcev (µg/L) po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena *PEPT2*, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

<i>PEPT2</i> Arg509Lys	<i>X</i> $\pm$ <i>SD</i>			<i>ANOVA</i>	<i>LSD (Post Hoc)</i>	
	GG	AG	AA	p	p	
cPb_2006 (µg/L)	301,71 $\pm$ 108,4 N=35	280,36 $\pm$ 92,22 N=47	261,18 $\pm$ 110,90 N=22	0,333		
IncPb_2008 (µg/L)	5,214 $\pm$ 0,444 N=36	5,285 $\pm$ 0,390 N=47	5,099 $\pm$ 0,263 N=25	0,153	AA - AG	0,053
cPb_2009 (µg/L)	196,34 $\pm$ 69,93 N=32	197,51 $\pm$ 68,38 N=41	155,11 $\pm$ 42,42 N=19	0,046	AA - AG AA - GG	0,020 0,030
dPb 2006_2009 (µg/L)	93,55 $\pm$ 97,84 N=31	81,74 $\pm$ 54,95 N=38	100,35 $\pm$ 95,55 N=17	0,695		

cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009: koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med leti 2006, 2008 in 2009
dPb_2006_2009: hitrost upada koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med letoma 2006 in 2009



Graf 15: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije *In_cPb_2008* glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (*PEPT2_2*), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).



Graf 16: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije *cPb_2009* glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (*PEPT2_2*), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).

Iz **Preglednice XIV** so razvidne statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,046$), kar kaže na značilen vpliv preučevanega polimorfizma na Pb^{2+} v krvi slovenskih steklobruscev. S testom ANOVA nismo uspeli dokazati značilnih povezav med povprečnimi vrednostmi cPb_2006, zato lahko zaključimo, da se tu naša populacija steklobruscev ni statistično značilno razlikovala v koncentracijah Pb^{2+} med posameznimi genotipi polimorfizma Arg509Lys. Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili mejno statistično značilne razlike v vrednostih lncPb_2008 ($p=0,053$, **Graf 15**) in potrdili dobljeno značilnost cPb_2009 ($p=0,020$) med genotipskima podskupinama AA in AG ter AA in GG ($p=0,030$, **Graf 16**). Rezultate smo grafično prikazali z BoxPlot metodo diagramov (»škatla z ročaji«). Najvišje povprečne vrednosti lncPb_2008 in cPb_2009 so izkazovali posamezniki genotipa AG in najnižje posamezniki genotipa AA. S testom ANCOVA vpliva genotipa na te vrednosti nismo mogli potrditi, saj nismo uspeli izključiti vpliva kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela ter delovne dobe nanje.

4.5.3.2 Vpliv polimorfizmov Leu350Phe in Arg 509Lys gena PEPT2 na pokazatelje toksičnosti Pb^{2+}

Za vrednotenje razlik v povprečnih vrednostih koncentracije ostalih pokazateljev toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev v določenem obdobju izpostavljenosti med posameznimi genotipi polimorfizmov Leu350Phe in Arg509Lys gena PEPT2 smo glede na normalnost porazdelitve spremenljivk uporabili teste kot pri ostalih dveh polimorfizmih (**Preglednici XV, XVI**). Zaradi boljše preglednosti so prikazani samo (mejno) statistično značilni $p < 0,05$ in $0,05 < p < 0,1$ rezultati, označeni s krepkim tiskom.

Preglednica XV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pokazateljev toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena PEPT2, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

PEPT2 Leu350Phe	X $\pm$ SD			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	CC	CT	TT	p	p	
Hb_2008 (g/L)	139,09 $\pm$ 11,65 N=34	142,14 $\pm$ 12,15 N=51	136,09 $\pm$ 8,816 N=23	0,099	TT - CT	0,036
lnGGT (μ kat/L)	-1,013 $\pm$ 0,870 N=34	-0,834 $\pm$ 0,928 N=51	-1,263 $\pm$ 0,697 N=23	0,144	TT - CT	0,051
leta_delovne_dobe	21,41 $\pm$ 5,070 N=34	22,72 $\pm$ 3,319 N=53	23,42 $\pm$ 4,010 N=24	0,155	CC - TT	0,068

Hb_2008: koncentracija hemoglobina v letu 2008
lnGGT: aktivnost jetrne gama-glutamyltransferaze
N = število vzorcev

S testom ANOVA smo dokazali mejno statistično značilno povezavo med povprečnimi vrednostmi Hb_2008 ($p_{ANOVA}=0,099$) in genotipi polimorfizma Leu350Phe (**Preglednica XV**). Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili (mejno) statistično značilne razlike v logaritmiranih vrednostih aktivnosti serumske gama-glutamiltransferaze (lnGGT, $p=0,051$) in vrednostih hemoglobina (Hb_2008, $p=0,036$) med genotipskima podskupinama TT in CT ter v delovni dobi preiskovancev ($p=0,068$) med genotipskima podskupinama CC in TT. S testom ANCOVA vpliva genotipa na te vrednosti nismo mogli potrditi, saj vpliva kombinacije spola, starosti, vrste dela in delovne dobe nanje nismo uspeli izključiti.

Preglednica XVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pokazateljev toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev po posameznih letih izpostavljenosti glede na genotip polimorfizma gena PEPT2, v okviru statistične analize rezultatov ANOVA ter LSD Post Hoc testov.

PEPT2 Arg509Lys	$\bar{X} \pm SD$			ANOVA	LSD (Post Hoc)	
	GG	AG	AA	p	p	
ALAD_2006 (nkat/L)	332,83 $\pm$ 161,24 N=35	399,66 $\pm$ 206,50 N=48	316,09 $\pm$ 114,20 N=22	0,104	GG – AG AA – AG	0,091 0,068
ALAD_2009 (nkat/L)	361,03 $\pm$ 172,59 N=32	447,78 $\pm$ 215,91 N=41	399,16 $\pm$ 173,65 N=19	0,166	GG – AG	0,061
Hb_2008 (g/L)	139,50 $\pm$ 10,77 N=36	143,21 $\pm$ 12,61 N=47	134,20 $\pm$ 7,84 N=25	0,006	AA – AG AA – GG	0,001 0,069
lnALT (μ kat/L)	-0,896 $\pm$ 0,540 N=29	-0,769 $\pm$ 0,630 N=43	-1,191 $\pm$ 0,461 N=19	0,032	AA – AG AA – GG	0,009 0,063
lnGGT (μ kat/L)	-1,003 $\pm$ 0,852 N=36	-0,782 $\pm$ 0,933 N=47	-1,325 $\pm$ 0,688 N=25	0,041	AA – AG	0,012

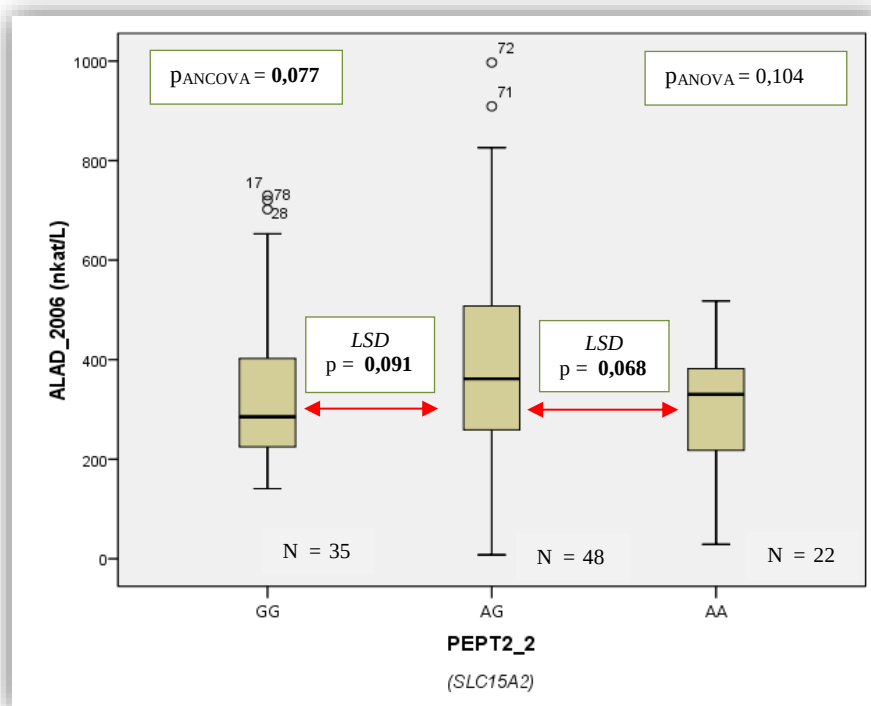
ALAD_2006, ALAD_2009: aktivnost dehidrataze δ -aminolevulininske kisline v letih 2006 in 2009

lnGGT: aktivnost serumske gama - glutamiltransferaze

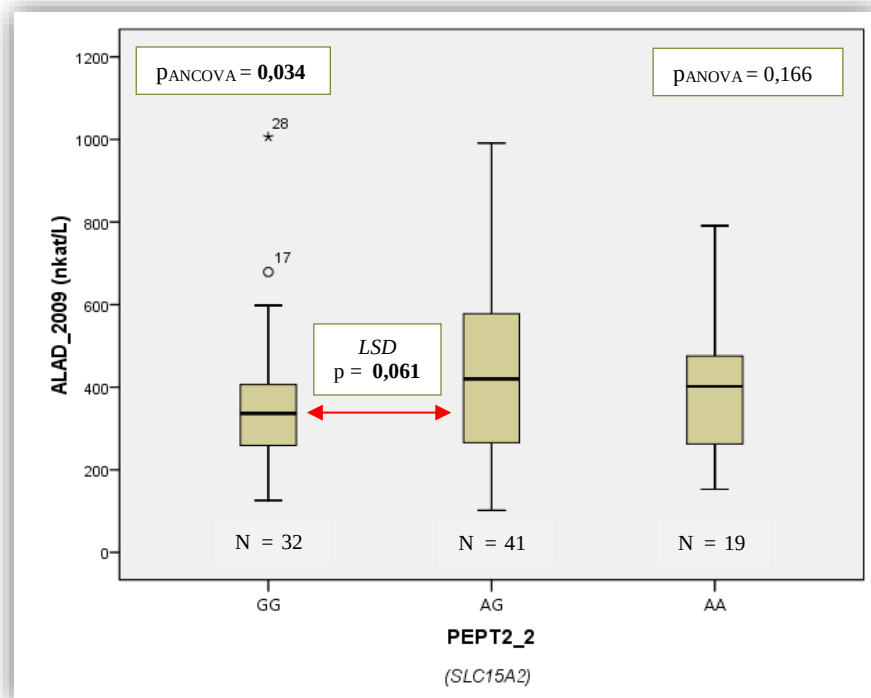
lnALT: aktivnost serumske alanin-aminotransferaze

N = število vzorcev

Iz **Preglednice XVI** so razvidne statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih Hb_2008 ($p_{ANOVA}=0,006$) in aktivnosti encimov lnALT ($p_{ANOVA}=0,032$) ter lnGGT ($p_{ANOVA}=0,041$), kar kaže na značilen vpliv preučevanega polimorfizma na te tri pokazatelje toksičnosti Pb^{2+} v krvi slovenskih steklobruscev. Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili mejno statistično značilne razlike v vrednostih encima ALAD_2006 med genotipskima podskupinama GG in AG ($p=0,091$) ter AA in AG ($p=0,068$) ter vrednostih ALAD_2009 med podskupinama GG in AG ($p=0,061$). Dobljeno značilnost Hb_2008 ($p=0,001$), lnALT ($p=0,009$) in lnGGT ($p=0,012$) smo z LSD Post Hoc testom potrdili med genotipskima podskupinama AA in AG ter AA in GG. S testom ANCOVA smo izključili vpliv kombinacije spola, starosti, vrste dela ter delovne dobe na vrednosti ALAD_2006 in ALAD_2009 preiskovancev ter s tem statistično še dodatno povečali vpliv genotipa nanje.



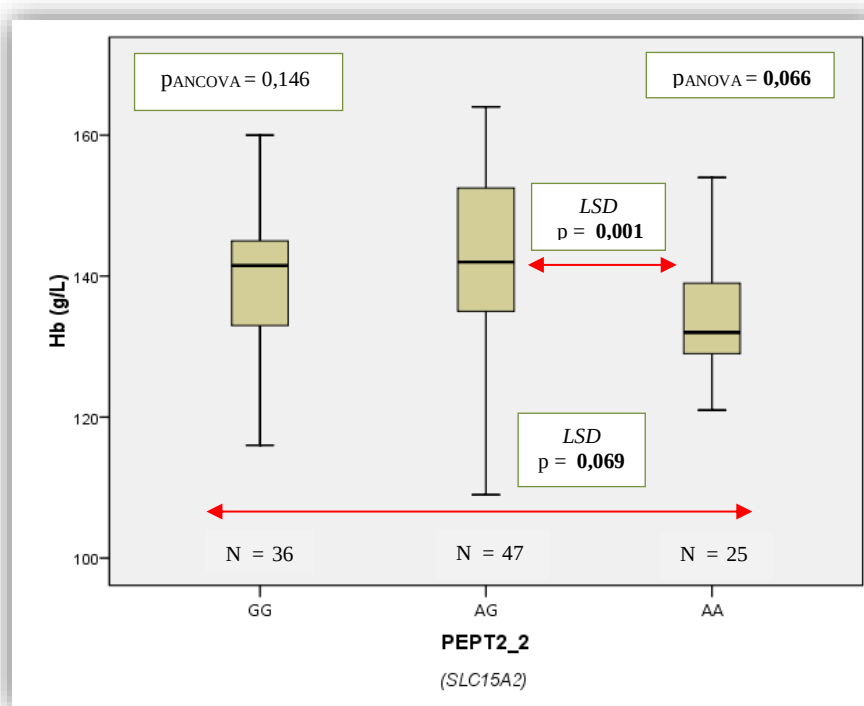
Graf 17: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti ALAD_2006 glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (PEPT2_2), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).



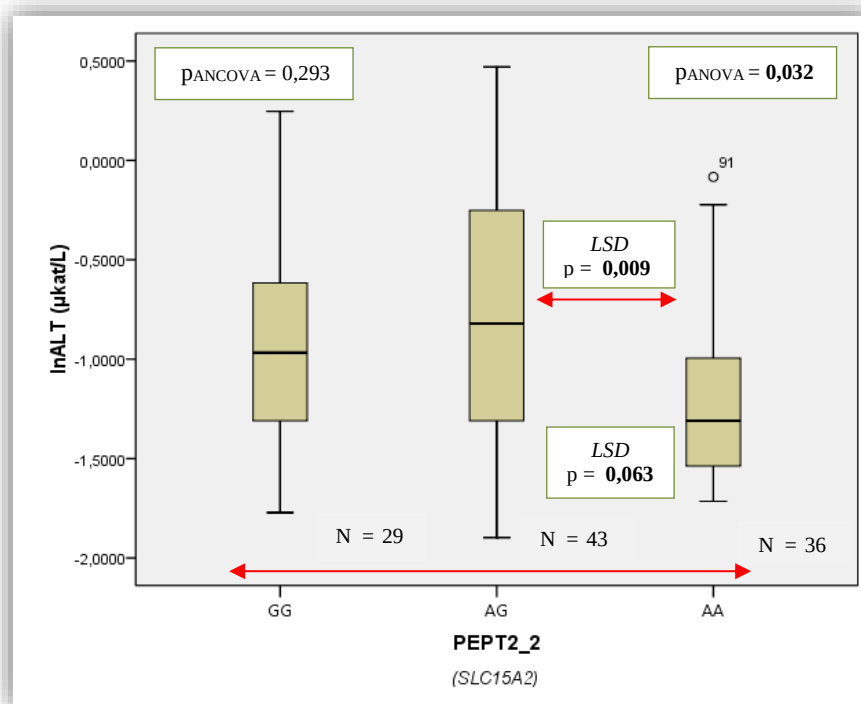
Graf 18: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti ALAD_2009 glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (PEPT2_2), v okviru LSD Post Hoc testa (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).

V obeh primerih so najvišje povprečne vrednosti ALAD_2006 (**Graf 17**) in ALAD_2009 (**Graf 18**) izkazovali posamezniki genotipa AG in najnižje posamezniki genotipa GG. Dobljeni rezultati so v skladu s pričakovanim, saj so najvišje vrednosti koncentracij cPb_2006 in cPb_2009 dosegali ravno nosilci alela G in najnižje tisti genotipa AA. Vemo, da je aktivnost ALAD obratnosorazmerna s koncentracijami Pb^{2+} v krvi, zato pri nižji aktivnosti encima tudi pričakujemo višje vrednosti Pb^{2+} v krvi, vendar v literaturi nismo zasledili študij, ki bi določale aktivnost encima v povezavi s polimorfizmom gena *PEPT2*.

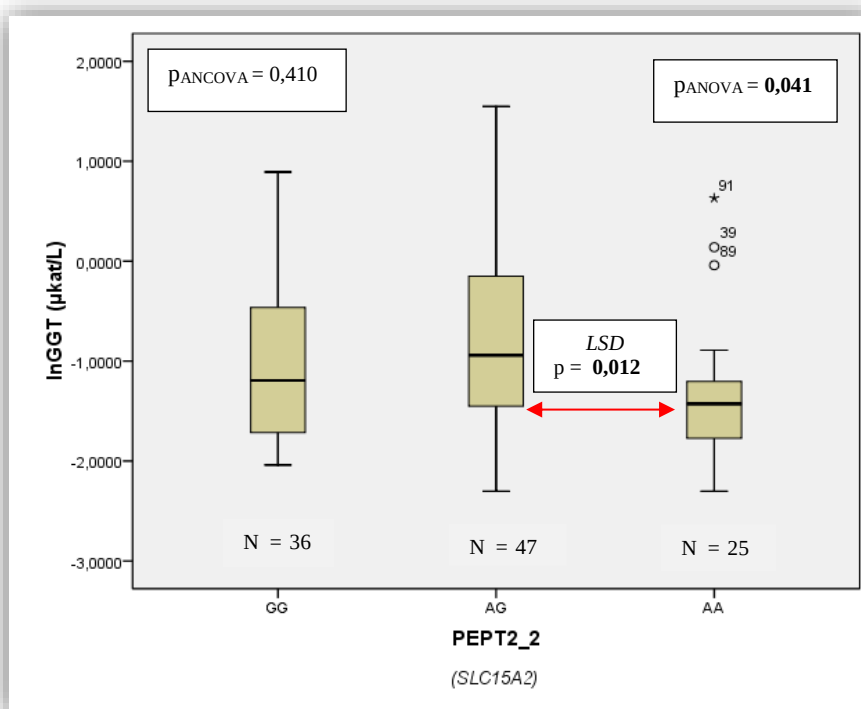
Najvišje vrednosti Hb_2008 (**Graf 19**), lnALT (**Graf 20**) in lnGGT (**Graf 21**) so v povprečju izkazovali posamezniki genotipa AG in najnižje posamezniki genotipa AA. Glede na vrednosti cPb_2008 smo take rezultate pri obeh transferazah tudi pričakovali, saj naj bi izpostavljenost višjim koncentracijam Pb^{2+} predstavljala višje tveganje za pojav nekaterih jetrnih in hematoloških bolezenskih stanj, pri čemer naj bi bile vrednosti jetrnih encimov povišane ter vrednosti Hb znižane. Vendar pa bi bilo priporočljivo rezultate potrditi na večjem številu preiskovancev, kot tudi upoštevati način življenja posameznika (alkohol, kajenje), ki lahko znatno vplivajo na omenjene škodjive učinke Pb^{2+} .



Graf 19: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije Hb_2008 glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (*PEPT2_2*), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).



Graf 20: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti $\ln\text{ALT}$ glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (PEPT2_2), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).



Graf 21: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti $\ln\text{GGT}$ glede na genotipske podskupine polimorfizma Arg509Lys (PEPT2_2), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, AA - mutiran homozigot, AG - heterozigot).

4.5.4 Vpliv kombinacije polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg509Lys* gena *PEPT2* na koncentracijo in ostale pokazatelje toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev

Poleg posamičnega vpliva polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg509Lys* gena *PEPT2* na vrednosti koncentracije Pb^{2+} in ostale pokazatelje njihove toksičnosti, nas je zanimala tudi analiza kombinacije pripadajočih genotipov za oba polimorfizma hkrati.

Postavili smo ničelno in njej nasprotno alternativno hipotezo ter potrdili ali zavrnili veljavnost hipoteze statistično značilne povezanosti genotipa kombinacije preučevanih polimorfizmov gena *PEPT2* z vrednostmi koncentracije Pb^{2+} ter pokazatelji njihove toksičnosti v določenem obdobju izpostavljenosti. S testom dvosmerne ANOVA statistično značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi Pb^{2+} glede na posamezne genotipske podskupine kombinacije polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg509Lys* v krvi slovenskih steklobruscev nismo uspeli dokazati, kar pomeni, da kombinacija teh dveh polimorfizmov verjetno nima značilnega vpliva na vrednosti Pb^{2+} delavcev v krvi (**Preglednica XVII**).

Preglednica XVII: Rezultati statistične analize koncentracij Pb^{2+} v krvi delavcev ($\mu\text{g/L}$) po posameznih letih izpostavljenosti glede na kombinacijo polimorfizmov gena *PEPT2*, v okviru statistične analize rezultatov testa dvosmerne ANOVA.

<i>PEPT2</i> Leu350Phe*Arg509Lys	Dvosmerna ANOVA (p)	N
cPb_2006 ($\mu\text{g/L}$)	0,315	104
IncPb_2008 ($\mu\text{g/L}$)	0,127	108
cPb_2009 ($\mu\text{g/L}$)	0,155	92
dPb_2006_2009 ($\mu\text{g/L}$)	0,982	86

cPb_2006, cPb_2008 in cPb_2009: koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med leti 2006, 2008 in 2009

dPb_2006_2009: hitrost upada koncentracije Pb^{2+} v obdobju izpostavljenosti med letoma 2006 in 2009

N = število vzorcev

Statistično značilen vpliv kombinacije polimorfizmov gena *PEPT2* pa se je pokazal v povezavi z aktivnostjo encima ALAD_2006, v **Preglednici XVIII** označen s krepkim tiskom ($p_{\text{ANOVA}}=0,010$), katerega povezavo smo tudi grafično predstavili (**Graf 22**). Z izključitvijo kombinacije kovariat spola, starosti, vrste dela in delovne dobe preiskovancev se je statistično značilen vpliv genotipa nanjo še dodatno povečal ($p_{\text{ANCOVA}}=0,003$).

Kljub statistično neznačilnim rezultatom dvosmerne ANOVA pa smo glede na posamezne genotipske kombinacije polimorfizmov *Leu350Phe* in *Arg509Lys* grafično želeli prikazati tudi vrednosti cPb_2006v krvi delavcev ter s tem pridobiti boljši vpogled v samo delovanje encima glede na koncentracijo Pb^{2+} in genotipe obeh polimorfizmov hkrati (**Graf 23**).

Preglednica XVIII: Rezultati statistične analize pokazateljev toksičnosti Pb^{2+} v krvi delavcev po posameznih letih izpostavljenosti glede na kombinacijo polimorfizmov gena PEPT2, v okviru statistične analize rezultatov testa dvosmerne ANOVA.

<i>PEPT2</i> Leu350Phe*Arg509Lys	Dvosmerna ANOVA (p)	N
ALAD_2006 (nkat/L)	0,010	105
lnALAD_2008 (nkat/L)	0,137	108
ALAD_2009 (nkat/L)	0,10	92
cistatin C_2008 (mg/L)	0,115	108
Hb_2008(g/L)	0,457	108
lnALT (μkat/L)	0,415	91
lnGGT (μkat/L)	0,379	108

ALAD_2006, lnALAD_2009, ALAD_2009: aktivnost dehidrataze δ-aminolevulinske kisline v letih 2006, 2008 in 2009
cistatin C_2008: koncentracija serumskega cistatina C v letu 2008

Hb_2008: koncentracija hemoglobina v letu 2008

lnGGT: aktivnost serumske gama - glutamiltransferaze

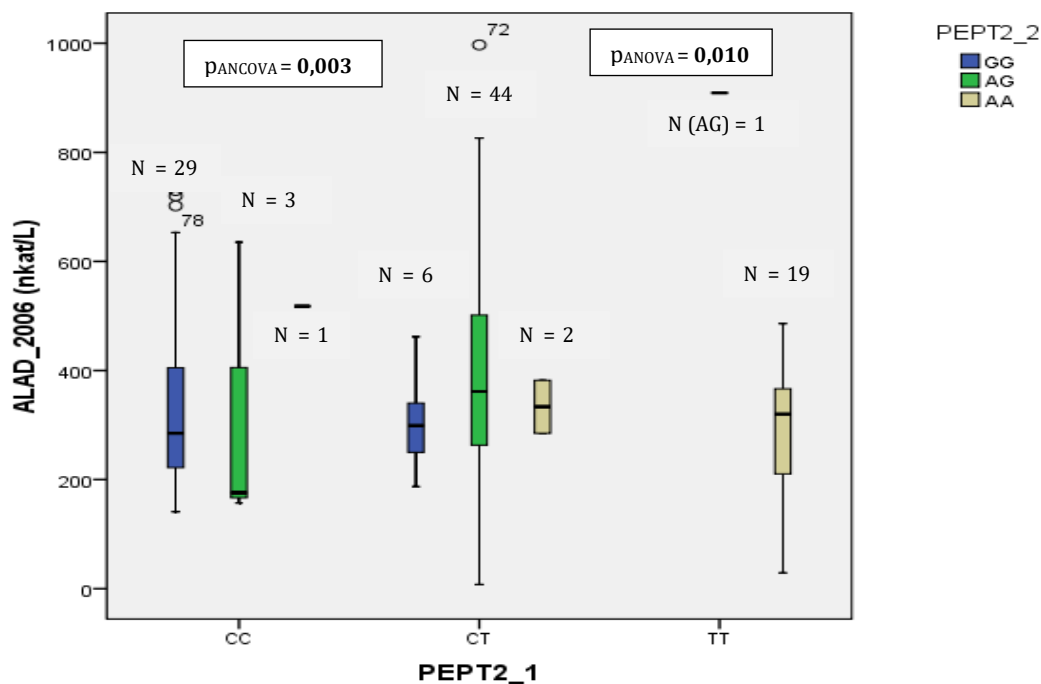
lnALT: aktivnost serumske alanin-aminotransferaze

N = število vzorcev

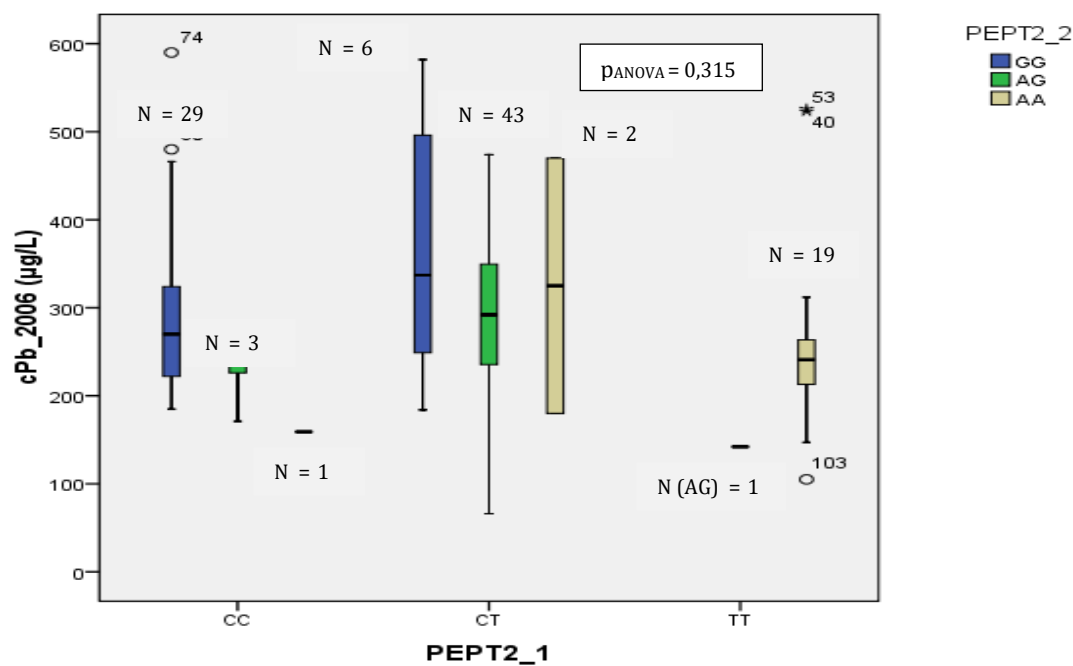
Vidimo, da najnižje aktivnosti encima v povprečju kažejo posamezniki genotipa AG polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine CC polimorfizma Leu350Phe in najvišje isti posamezniki genotipa polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine TT (**Graf 22**). Vemo, da je aktivnost encima obratnosorazmerna z vrednostmi Pb^{2+} v krvi, zato lahko upravičeno domnevamo, da je najvišja aktivnost encima ALAD_2006 v tem primeru posledica najnižjih koncentracij Pb^{2+} v krvi posameznikov genotipa AG polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine TT polimorfizma Leu350Phe (**Graf 23**). Posamezniki genotipov AA in AG polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine CC polimorfizma Leu350Phe imajo v povprečju nižjo aktivnost ALAD_2006 encima v primerjavi s posamezniki istih genotipov polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine CT. Prav tako opazimo, da aktivnost ALAD_2006 pri posameznikih genotipa AA polimorfizma Arg509Lys pada po naslednjem zaporedju genotipskih podskupin polimorfizma Leu350Phe: CC, CT in TT. Po istem zaporedju genotipov polimorfizma Leu350Phe aktivnost ALAD_2006 pri posameznikih genotipa AG polimorfizma Arg509Lys narašča.

Vendar pa na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo delati trdnih zaključkov, saj imamo premajhno število preiskovancev s kombinacijo posameznih genotipov preučevanih polimorfizmov. Že za genotipa AA in AG polimorfizma Arg509Lys v skupini genotipov CC in TT polimorfizma Leu350Phe imamo samo po enega predstavnika, medtem ko pri

zadnji skupini polimorfizma Leu350Phe, predstavnika z genotipom GG polimorfizma Arg509Lys sploh nimamo. Potrebne bi bile študije na večji populaciji preiskovancev.



Graf 22: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) katalitične aktivnosti ALAD_2006 glede na genotipske podskupine kombinacij polimorfizma Leu50Phe (PEPT2_1) in Arg509Lys (PEPT2_2), v okviru dvosmernega testa ANOVA.



Graf 23: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije cPb_2006 glede na genotipske podskupine kombinacij polimorfizma Leu50Phe (PEPT2_1) in Arg509Lys (PEPT2_2), v okviru dvosmernega testa ANOVA.

5 SKLEP

V okviru opravljenega diplomskega dela na populaciji 112 slovenskih steklobruscev smo prišli do naslednjih sklepov:

ALAD Lys59Asn (rs1800435)

- statistično značilen vpliv polimorfizma Lys59Asn na vrednosti cPb_2006 ($p_{ANOVA}=0,003$), kjer posamezniki genotipa CG izkazujejo v povprečju najvišje in posamezniki genotipa GG najnižje koncentracije Pb^{2+} v krvi. Skupina združenih genotipov CG+CC ima značilno višje vrednosti cPb_2006 glede na genotip GG ($p_{ANOVA}=0,006$).
- statistično značilen vpliv polimorfizma Lys59Asn na hitrost 4 -letnega upada koncentracije Pb^{2+} v krvi (dPb 2006_2009; $p_{ANOVA}=0,011$), kjer najnižji padec v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa CC in najvišji tisti genotipa CG.
- (mejno) statistično značilen vpliv polimorfizma Lys59Asn na aktivnost encima ALAD_2006 ($p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,051$) in lnALAD_2008 ($p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,080$) ter vrednosti Hb_2008 ($p_{LSD \text{ Post Hoc}}=0,045$), kjer v prvih dveh primerih najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa GG in najnižje posamezniki genotipa CC. Pri Hb_2008 najvišje vrednosti izkazujejo posamezniki genotipa CG.
- statistično neznačilen vpliv polimorfizma Lys59Asn na vrednosti lncPb_2008 ($p_{ANOVA}=0,325$) in cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,711$), kjer posamezniki genotipa CC v povprečju izkazujejo najvišje in posamezniki genotipa GG najnižje Pb^{2+} v krvi. Skupina združenih genotipov CG+CC ima v povprečju višje, vendar statistično neznačilne vrednosti lncPb_2008 ($p_{ANOVA}=0,136$) in cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,407$).

eNOS Asp298Glu (rs1799983)

- mejno statistično značilen vpliv polimorfizma Asp298Glu na vrednosti lncPb_2008 ($p_{ANOVA}=0,051$) in cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,070$), kjer najvišje koncentracije Pb^{2+} v krvi v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa GG in najnižje posamezniki genotipa GT. Skupina združenih genotipov GT+TT ima (mejno) statistično značilno nižje vrednosti lncPb_2008 ($p_{ANOVA}=0,050$) in cPb_2009 ($p_{ANOVA}=0,040$) glede na genotip GG.

- mejno statistično značilen vpliv polimorfizma Asp298Glu na aktivnost encima ALAD_2006 ($p_{\text{LSD Post Hoc}}=0,079$) in ALAD_2009 ($p_{\text{LSD Post Hoc}}=0,088$), kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipov GT in TT ter najnižje posamezniki genotipa GG.
- mejno statistično značilen vpliv polimorfizma Asp298Glu na vrednosti cistatina C_2008 ($p_{\text{LSD Post Hoc}}=0,063$), kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa TT in najnižje posamezniki genotipa GT.

PEPT2 Leu350Phe (rs2257212)

- mejno statistično značilen vpliv polimorfizma Leu350Phe na vrednosti cPb_2009 ($p_{\text{ANOVA}}=0,081$) in lncPb_2008 ($p_{\text{LSD Post Hoc}}=0,063$), kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa CT in najnižje genotipa TT.
- mejno statistično značilen vpliv polimorfizma Leu350Phe na vrednosti Hb_2008 ($p_{\text{ANOVA}}=0,099$) in aktivnost encima lnGGT ($p_{\text{LSD Post Hoc}}=0,051$), kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa CT in najnižje genotipa TT.

PEPT2 Arg509Lys (rs1143672)

- (mejno) statistično značilen vpliv polimorfizma Arg509Lys na vrednosti cPb_2009 ($p_{\text{ANOVA}}=0,046$) in lncPb_2008 ($p_{\text{LSD Post Hoc}}=0,053$), kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa AG in najnižje tisti genotipa AA.
- statistično značilen vpliv polimorfizma Arg509Lys na vrednosti Hb_2008 ($p_{\text{ANOVA}}=0,006$), lnALT ($p_{\text{ANOVA}}=0,032$) in lnGGT ($p_{\text{ANOVA}}=0,041$), kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa AG in najnižje genotipa AA
- (mejno) statistično značilen vpliv polimorfizma Arg509Lys (LSD Post Hoc) na encimsko aktivnost ALAD_2006 in ALAD_2009, kjer najvišje vrednosti v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa AG in najnižje genotipa GG.

PEPT2 Leu350Phe + Arg509Lys

- statistično značilen vpliv kombinacije polimorfizmov gena *PEPT2* na aktivnost encima ALAD_2006 ($p_{\text{ANOVA}}=0,010$), kjer najnižjo aktivnost v povprečju izkazujejo posamezniki genotipa AG polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine CC polimorfizma Leu350Phe in najvišjo posamezniki istega genotipa polimorfizma Arg509Lys genotipske podskupine TT. Aktivnost ALAD_2006 pri

posameznikov genotipa AA polimorfizma Arg509Lys pada po naslednjem zaporedju genotipskih podskupin polimorfizma Leu350Phe: CC, CT in TT, kjer po istem zaporedju genotipov pri posameznikih genotipa AG polimorfizma Arg509Lys le - ta narašča.

Za ustrezno vrednotenje rezultatov povezanosti posameznih genotipov preučevanih polimorfizmov z višjimi koncentracijami Pb^{2+} in ostalimi pokazatelji njegove toksičnosti bi bilo potrebno dobljene rezultate testirati na večjem številu preiskovancev in tako povečati statistično moč naše analize. Smiselno bi bilo opraviti meritve koncentracij Pb^{2+} tudi v kosteh in njihove vrednosti primerjati med genotipi analiziranih polimorfizmov, saj je znano, da je kortikalni del kostnine, ki služi kot počasi sproščujoč vir Pb^{2+} , pokazatelj akumulirane količine Pb^{2+} skozi skozi daljše časovno obdobje, medtem ko je koncentracija Pb^{2+} v krvi pokazatelj samo trenutne izpostavljenosti izpred nekaj tednov do mesecev in zato slab označevalec obremenitve s svincem. Prav tako vemo, da lahko v določenih situacijah prihaja do povečanega prehajanja Pb^{2+} iz intracelularnih zalog kosti v plazmo, zato bi bilo pametno določiti tudi tiste posameznike, ki so bolj dovzetni za opisan proces ter v celoti upoštevati življenjski stil, postmenopavzni in socialni status, stopnjo izobrazbe ter prehranjenost posameznika. Redna prehrana, bogata z vitaminom C, E, Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} in Se namreč upočasni absorpcijo Pb^{2+} , medtem ko jo kajenje in prekomerno uživanje alkohola pospešita. Slednje bi bilo zanimivo v raziskavo vključiti kot kovariate. Zelo verjetno pa imajo pomembno vlogo tudi polimorfizmi ostalih genov, kot sta *HFE* - gen za hemokromatozo in *VDR* - gen za receptor vitamina D, ki preko uravnavanja absorpcije kalcija in železa verjetno vplivata tudi na samo absorpcijo Pb^{2+} .

6 LITERATURA

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile For Lead. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2007: 277-300.
2. Casas JS, Sordo J: Lead: Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects. Elsevier, Amsterdam, 2006: 1-38.
3. Hernberg S: Lead Poisoning in the Historical Perspective. American Journal of Industrial Medicine 2000; 38: 244-254.
4. Lead Association (ILA): Lead facts. <http://www.ila-lead.org/lead-facts/history-of-lead>.
5. International Programme on Chemical safety (IPCS): Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead. Geneva 1995: 1-180.
6. Center for Disease Control and Prevention (CDC): Preventing Lead Poisoning in Young Children: A Statement by the Center for Disease Control Atlanta. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2005.
7. Voler A: Zastrupitev s svincem. Izzivi družinske medicine - zbornik seminarjev študentov MF UM 2007/08, 259-264.
8. Černe K: Toksikologija težkih kovin. Med Razgl 2009; 48: 101-113.
9. Uradni list RS, št. 9/2011: Praktične smernice za izvajanje zdravstvenega nadzora in biološkega monitoringa za svinec.
10. Beritić T, Duraković Z: Olovo v: Duraković Z: Klinična toksikologija, Grafos Zagreb 2000, 168-177.
11. Health Protection Agency (HPA): Lead Toxicological Overview, Ver. 3: Center for Radiation, Chemical and Environmental Hazards, 2012: 1-14.
12. Jamšek M, Šarc L: Diagnostika in zdravljenje zastrupitev s kovinami. Med Razgl 2009; 48: 101-113.
13. Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB: Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: A Review. Rev Environ Health. 2009; 24(1): 15-45.
14. Staudinger KC, Roth VS: Occupational lead Poisoning. Am Fam Physician 1998; 57(4): 719-726.
15. Mahaffey KR: Nutrition and Lead: Strategies for Public Health. Environ Health Perspect 1995; 103 (Suppl 6): 191-196.
16. Rabinowitz MB: Toxicokinetics of Bone Lead. Environ Health Perspect: 1991; 91: 33-37.

17. Patrick L: Lead toxicity, a review of the literature: part I: exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev* 2006; 11:2-22.
18. Silbergeld EK: Lead in Bone: Implications for Toxicology During Pregnancy and Lactation. *Environ Health Perspect* 1991; 91:63-70.
19. Ivartnik M, Eržen I: Uporaba modela IEUBK za napoved vsebnosti svinca v krvi otrok pri raziskavah in sanaciji okolja v Zgornji Mežiški dolini. *Zdrav Var* 2010; 2: 76-85.
20. Pagliuca A, Mufti GJ, Baldwin D, Wallis RM, Bellingham AJ: Lead poisoning: clinical, biochemical, and haematological aspects of a recent outbreak. *J Clin Pathol* 1990; 43(4): 277–281.
21. Landrigan PJ: Strategies for Epidemiologic Studies of Lead in Bone in Occupationally Exposed Populations. *Environ Health Prospect* 1991:91, pp. 81-86.
22. Eman MA, Gordon FA: Heavy Metal Poisoning and Cardiovascular Disease. *J Toxicol.* 2011; 11: 870125.
23. Vaziri ND: Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(2): H454–H465.
24. Conradi S, Ronnevi LO, Vesterberg O: Increased plasma levels of lead in patients with amyotrophic lateral sclerosis compared with control subjects as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978; 41(5): 389-393.
25. International Agency for the Research on Cancer (IARC): Inorganic and Organic Lead Compounds: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 87, Lyon, 2006.
26. Patrick L: Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern Med Rev* 2006; 11(2): 114-127.
27. Krnjak L, Skitek M: Pomembnost porfirinov v laboratorijski diagnostiki. *Farmacevtski vestnik* 2005; 56: 125-130.
28. Onalaja AO, Claudio L: Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. *Environ Health Perspect* 2000; 108(1): 23-28.
29. Wetmur JG: Influence of the common human delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism on lead body burden. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (suppl 3): 215-219.
30. Wetmur JG, Bishop DF, Cantelmo C, Desnick RJ: Human delta-aminolevulinate dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83 (20): 7703–7707.

31. Gibbs PN, Chaudhry AG, Jordan PM: Purification and properties of 5-aminolevulinatide dehydratase from human erythrocytes. *Biochem J.* 1985; 230 (1): 25–34.
32. Erskine PT, Coates L, Butler D, Youell JH, Brindley AA, Wood SP, Martin J, Warren MJ, Shoolingin-Jordan PM, Cooper JB: X-ray structure of a putative reaction intermediate of 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 2003; 373: 733–738.
33. Jaffe EK, Li J, Kervinen J, Dunbrack RL: The Molecular Mechanism of Lead Inhibition of Human Porphobilinogen Synthase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:1531-1537.
34. Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ: Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet.* 1991; 49 (4): 757–763.
35. Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ: δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A Huge Review. *American Journal of Epidemiology* 2001; 154: 1-13.
36. Benkmann HG, Bogdanski P, Godde HW: Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in various populations. *Hum. Hered.* 1983; 33: 62-64.
37. Chia SE, Zhou HJ, Yap E, Tham MT, Dong NV, Hong NT, Chia KS: Association of renal function and δ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism among Vietnamese and Singapore workers exposed to inorganic lead. *Occup Environ Med* 2006; 63: 180-186.
38. Hu H, Wu MT, Cheng Y, Sparrow D, Kelsey KT: The δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) Polymorphism and Bone and Blood Lead Levels in Community-Exposed Men: The Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 827- 832.
39. Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT: Polymorphism in the δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Gene may Modify the Pharmacokinetics and Toxicity of Lead. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 248-253.
40. Leggett RW: An Age-Specific Kinetic Model of Lead Metabolism in Humans. *Environmental Health Perspectives* 1993; 101: 598-616.
41. Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey K, Todd AC: Association of Blood Lead, Dimercaptosuccinic Acid-Chelatable Lead, and Tibia Lead with Polymorphisms in the Vitamin D Receptor and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genes. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 949-954.
42. Scinicariello F, Murray HE, Moffett DB, Abadin HG, Sexton MJ, Fowler BA: Lead and delta aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: where does it lead? A meta-analysis. *Environ Health Prospect* 2007; 115(1): 35-41.
43. Andrew PJ, Mayer B: Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* 1999; 43: 521-531.

44. Gonçalves R, Gowdak MM, Pereira AC: Genetics and cardiovascular system: influence of human genetic variants on vascular function. *Genes nutr.* 2011; 6(1): 55-62.
45. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593-615.
46. Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM: eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol.* 2011; 210(3): 271-284.
47. Vaziri ND, Ding Y: Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension Journal of the American Heart Association* 2001; 37(2): 223-226.
48. Dafni C, Drakoulis N, Landt O, Panidis D, Reczko M, Cokkinos DV: Association of the eNOS E298D polymorphism and the risk of myocardial infarction in the Greek population. *BMC Med Genet.* 2010; 11: 133-140.
49. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A: Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298 → Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Cardiovascular Medicine* 2002; 87: 525–528.
50. Shankarishan P, Borah PK, Ahmed G, Mahanta J: Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and the Risk of Hypertension in an Indian Population. *BioMed Research International* 2014: 1-12.
51. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-17488.
52. Sofowora G, Dishy V, Xie HG, Imamura H, Nishimi Y, Morales CR, Morrow JD, Kim RB, Stein CM, Wood AJ: In-vivo effects of Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11(9): 809-814.
53. Weaver VM, Schwartz BS, Jaar BG, Ahn KD, Todd AC, Lee SS, Kelsey KT, Silbergeld EK, Lustberg ME, Parsons PJ, Wen J, Lee BK: Associations of Uric Acid with Polymorphisms in the δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase, Vitamin D Receptor, and Nitric Oxide Synthase Genes in Korean Lead Workers. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1509-1515.
54. Nishevitha NS, Angeline T, Jeyara N: Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298→Asp polymorphism (G894T) among south Indians. *Indian J Med Res* 2009: pp 68-71.
55. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y: Lack of Evidence for Association Between the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Hypertension. *Journal of the American Heart Association* 1999; 33: 933-936.

56. Lustberg ME, Schwartz BS, Lee BK, Todd AC, Silbergeld EK: The G894-T894 Polymorphism in the Gene for Endothelial Nitric Oxide Synthase and Blood Pressure in Lead-Exposed Workers From Korea. *J Occup Environ Med.* 2004; 46: 584 -590.
57. Theppeang K, Schwartz BS, Lee BK, Lustberg ME, Silbergeld EK, Kelsey KT, Parsons PJ, Todd AC: Associations of Patella Lead With Polymorphisms in the Vitamin D Receptor, δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase and Endothelial Nitric Oxide Synthase Genes. *J Occup Environ Med.* 2004; 46: 528 -537.
58. Kamal MA, Keep RF, Smith DE: Role and Relevance of PEPT2 in Drug Deposition, Dynamics, and Toxicity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008; 23(4): 236-242.
59. Jappar D: Role of proton - coupled oligopeptide transporters in small peptide absorption and disposition. Doktorska disertacija, The University of Michigan, College of Pharmacy, ZDA 2009.
60. Daniel H, Spanier B, Kottra G, Weitz D: From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology* 2006; 21: 93-102.
61. Daniel H, Rubio-Aliaga I: An update on renal peptide transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F885-F892.
62. Meredith D, Boyd CAR: Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57: 754-778.
63. Liu W, Liang R, Ramamoorthy S, Fei YJ, Ganapathy ME, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH: Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1235: 461-466.
64. Boehmer C, Palmada M, Klaus F, Jeyaraj S, Lindner R, Laufer J, Daniel H, Lang F: The Peptide Transporter PEPT2 is Targeted by the Protein Kinase SGK1 and the Scaffold Protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22: 705-714.
65. Noshiro R, Anzai N, Sakata T, Miyazaki H, Terada T, Shin HJ, He X, Miura D, Inui K, Kanai Y, Endou H: The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney International* 2006; 70: 275-282.
66. Ocheltree SM, Shen H, Hu Y, Xiang J, Keep RF, Smith DE: Role of PEPT2 in the Choroid Plexus Uptake of Glycylsarcosine and 5-Aminolevulinic Acid: Studies in Wild-Type and Null Mice. *Pharmaceutical Research* 2004; 21(9): 1680-1685.
67. Hu Y, Shen H, Keep RF, Smith DE: Peptide transporter 2 (PEPT2) expression in brain protects against 5-aminolevulinic acid neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 2007; 103: 2058-2065.
68. Sobin C, Parisi N, Schaub T, Gutierrez M, Ortega AX: δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Single Nucleotide Polymorphism 2 and Peptide Transporter 2*2 Haplotype

May Differentially Mediate Lead Exposure in Male Children. Arch Environ Contam Toxicol. 2011; 61(3): 521-529.

69. Sobin C, Flores-Montoya MG, Gutierrez M, Parisi N, Schaub T: δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Single Nucleotide Polymorphism 2 (*ALAD2*) and Peptide Transporter 2*2 Haplotype (*hPEPT2*2*) Differently Influence Neurobehavior in Low-Level Lead Exposed Children. Neurotoxicol Teratol. 2015; 47: 137-145.

70. Pinsonneault J, Nielsen CU, Sadee W: Genetic Variants of the Human H⁺/Dipeptide Transporter PEPT2: Analysis of Haplotype Functions. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2004; 311: 1088-1096.

7 PRILOGE

7.1 Priloga 1: Rezultati izolacije DNA vzorcev preiskovancev

Preglednica XIX: Izmerjene koncentracije vzorcev izolirane DNA pri valovni dolžini 260 nm.

Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/μl)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/μl)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/μl)
1	165,7	39	166,9	76	83,7
2	79,8	40	48,03	77	42,8
3	76,7	41	267,01	78	180,6
4	110,7	42	223,3	79	4,9
5	167,1	43	166,8	80	110,2
6	12,7	44	73,7	81	70,1
7	283,1	45	162,6	82	182,9
8	142,8	46	16,07	83	87,1
9	18,03	47	151,2	84	131,7
10	112,4	48	218,6	85	108,5
11	152,3	49	162,5	86	147,1
12	19,9	50	87,8	87	304,1
13	168,3	51	115,2	88	190,5
14	176,9	52	102,5	89	279,2
15	65,6	53	185,5	90	151,6
16	113,7	54	166,7	91	73,2
17	215,9	55	254,3	92	283,6
18	158,2	56	255,4	93	104,7
19	64,8	57	60,7	94	11,8
20	140,3	58	147,6	95	69,9
21	81,97	59	146,6	96	176,7
22	64,3	60	411,4	97	223,6
23	67,8	61	91,9	98	249,6
24	215,5	62	365,8	99	195,2
25	94,9	63	86,07	100	164,4
26	104,9	64	176,2	101	320,03
27	209,9	65	159,4	102	230,5
28	111,9	66	205,8	103	382,6
29	163,3	67	15,4	104	156,2
30	10,6	68	127,5	105	301,4

Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/μl)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/μl)	Oznaka vzorca	Koncentracija DNA (ng/μl)
31	153,3	69	76,4	106	13,8
32	105,9	70	255,7	107	162,1
33	53,2	71	143,3	108	74,4
34	103,6	72	12,9	109	141,1
35	210,1	73	85,8	110	220,9
36	141,7	74	307,1	111	292,7
37	40,6	75	25,2	112	270,5

7.2 Priloga 2: Rezultati genotipizacije

Preglednica XX: Genotipizacija polimorfizmov Lys59Asn gena ALAD, Asp298Glu gena eNOS ter Leu350Phe in Arg509Lys gena PEPT2 preiskovancev.

Št.vzorca	Genotip za polimorfizem			
	ALAD Lys59Asn	eNOS Asp298Glu	PEPT2 Leu350Phe	PEPT2 Arg509Lys
1	CG	GT	AG	CT
2	GG	GT	GG	CC
3	GG	GT	AA	TT
4	GG	GG	AA	TT
5	GG	GT	GG	CC
6	GG	TT	AA	TT
7	CG	GG	AG	CT
8	GG	GT	AA	CT
9	GG	GG	GG	TT
10	GG	GT	AG	CT
11	CG	GT	AG	CT
12	GG	GG	GG	CT
13	GG	GG	GG	CC
14	GG	GG	AA	CC
15	GG	GT	AG	TT
16	GG	GT	GG	CT
17	GG	GT	GG	CC
18	GG	GG	GG	CC
19	CC	GT	GG	CC
20	GG	GT	AA	CC
21	GG	GG	GG	TT

Št.vzorca	Genotip za polimorfizem			
	<i>ALAD</i> Lys59Asn	<i>eNOS</i> Asp298Glu	<i>PEPT2</i> Leu350Phe	<i>PEPT2</i> Arg509Lys
22	GG	GT	AG	CC
23	GG	GG	AG	CT
24	CG	GT	AG	CT
25	CG	GG	GG	CT
26	GG	GG	GG	CC
27	GG	GG	GG	CC
28	GG	GT	GG	CC
29	GG	GG	AG	CC
30	GG	GG	GG	CT
31	GG	GG	AA	CC
32	GG	GG	GG	CC
33	GG	GG	AG	CC
34	CG	GT	AG	CT
35	GG	GT	AG	CT
36	GG	TT	AG	CT
37	GG	GG	AG	CT
38	GG	GT	AA	CT
39	GG	GT	AA	TT
40	CG	TT	GG	TT
41	CG	GG	AA	CC
42	CG	GT	AG	TT
43	GG	GT	AG	CT
44	GG	GG	AA	CT
45	GG	TT	AA	CT
46	GG	GT	GG	CT
47	CG	GT	GG	CT
48	GG	GT	AG	CT
49	GG	GG	GG	CT
50	GG	GT	AG	CC
51	GG	GG	AG	CT
52	GG	GT	AA	CT
53	GG	GT	AG	TT
54	GG	GT	AG	CT
55	GG	GT	GG	CT
56	GG	GT	AG	CT

Št.vzorca	Genotip za polimorfizem			
	<i>ALAD</i> Lys59Asn	<i>eNOS</i> Asp298Glu	<i>PEPT2</i> Leu350Phe	<i>PEPT2</i> Arg509Lys
57	CG	GT	GG	CT
58	GG	GG	GG	CC
59	GG	GG	GG	CC
60	GG	GG	AG	CC
61	CG	GT	AG	CT
62	GG	GG	GG	CT
63	GG	GT	AG	CC
64	GG	GT	GG	CT
65	GG	GG	AA	CT
66	GG	GG	AA	TT
67	GG	GG	AA	TT
68	CG	TT	GG	TT
69	GG	GT	AG	CC
70	GG	GG	AG	CT
71	GG	GT	AG	TT
72	GG	GG	GG	CT
73	GG	GT	GG	CC
74	CG	GT	AG	CC
75	GG	GT	AG	CT
76	GG	GT	AG	CT
77	GG	GG	GG	CT
78	GG	GT	GG	CC
79	GG	GT	AG	CC
80	GG	TT	AA	CC
81	CC	GG	GG	TT
82	GG	GG	AA	CC
83	GG	TT	AG	TT
84	GG	GT	GG	CT
85	CG	GG	GG	CT
86	CG	GG	AA	CC
87	GG	GT	AA	TT
88	GG	GT	AA	TT
89	GG	GT	AG	TT
90	GG	GG	AA	CT
91	GG	GG	GG	TT

Št.vzorca	Genotip za polimorfizem			
	ALAD Lys59Asn	eNOS Asp298Glu	PEPT2 Leu350Phe	PEPT2 Arg509Lys
92	GG	GG	AA	CC
93	CG	GG	AG	TT
94	GG	GG	AG	CT
95	CG	GG	AG	CC
96	GG	GG	GG	CT
97	GG	GT	AG	CC
98	GG	GG	AG	CT
99	GG	GG	AG	CT
100	GG	GG	AG	CT
101	GG	TT	AA	CT
102	GG	GG	AG	TT
103	GG	GG	AA	CT
104	GG	GT	AG	TT
105	CC	TT	AG	CT
106	GG	GT	AG	CT
107	GG	GG	AG	CT
108	GG	GG	AA	CT
109	GG	GT	AG	TT
110	CG	GG	AG	CC
111	GG	GT	AG	CT
112	CC	GT	AG	CT

7.3 Priloga 3: Rezultati statistične analize

7.3.1 Klinične značilnosti in povprečne vrednosti spremenljivk preiskovancev

Preglednica XXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk preiskovancev.

Spremenljivka	X $\pm$ SD	N
starost (leta)	44,03 $\pm$ 3,93	112
ln_starost (leta)	3,781 $\pm$ 0,088	112
leta_delovne_dobe	22,47 $\pm$ 4,11	111
sis_RR_tlak_2008	130,25 $\pm$ 17,09	105
dia_RR_tlak_2008	84,46 $\pm$ 10,43	105
lnsis_RR_tlak_2008	4,861 $\pm$ 0,130	105

Spremenljivka	X $\pm$ SD	N
India_RR_tlak_2008	4,429 $\pm$ 0,124	105
Hb_2008	139,89 $\pm$ 11,51	108
Ht_2008	0,448 $\pm$ 0,376	108
lnHt_2008	-0,868 $\pm$ 0,239	108
cistatin C_2008	0,671 $\pm$ 0,067	108
cPb_2006	283,49 $\pm$ 101,90	104
cPb_2008	198,57 $\pm$ 76,18	108
lnPb_2008	5,218 $\pm$ 0,388	108
cPb_2009	188,35 $\pm$ 66,09	92
dPb 2006_2009	89,67 $\pm$ 80,42	86
ALAD_2006	359,87 $\pm$ 178,29	105
ALAD_2008	461,99 $\pm$ 210,02	108
lnALAD_2008	6,047 $\pm$ 0,415	108
ALAD_2009	407,57 $\pm$ 195,21	92
EP_2008	5,313 $\pm$ 2,496	108
lnEP_2008	1,579 $\pm$ 0,417	108
GGT	0,585 $\pm$ 0,713	108
lnGGT	-0,982 $\pm$ 0,873	108
ALT	0,490 $\pm$ 0,330	91
lnALT	-0,898 $\pm$ 0,587	91

7.3.2 ALAD (rs1800435; Lys59Asn)

Preglednica XXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa ANOVA.

Spremenljivka	X $\pm$ SD			Signifikanca (p)
	GG	CG	CC	
ln_starost (leta)	3,781 $\pm$ 0,087 N=89	3,777 $\pm$ 0,102 N= 19	3,794 $\pm$ 0,056 N= 4	0,937
leta_delovne_dobe	22,39 $\pm$ 4,126 N=88	22,79 $\pm$ 4,366 N=19	22,75 $\pm$ 2,986 N=4	0,920
cPb_2006 (μ g/L)	269,92 $\pm$ 91,30 N=83	358,35 $\pm$ 124,51 N=17	247,00 $\pm$ 85,37 N=4	0,003
lnPb_2008 (μ g/L)	5,189 $\pm$ 0,383 N=85	5,332 $\pm$ 0,387 N=19	5,294 $\pm$ 0,505 N=4	0,325
cPb_2009 (μ g/L)	185,51 $\pm$ 66,55	199,93 $\pm$ 59,63	200,25 $\pm$ 91,08	0,711

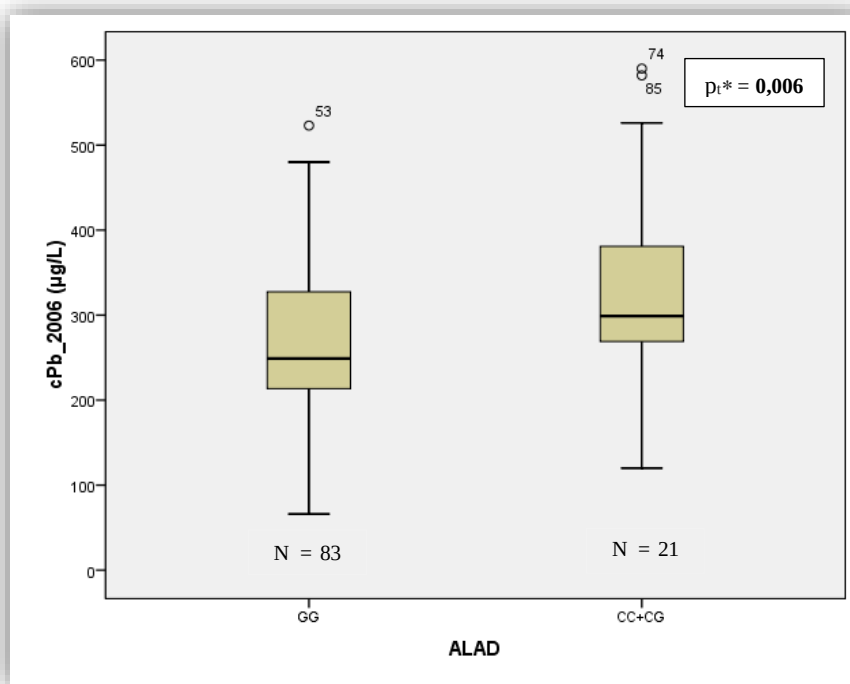
Spremenljivka	X±SD			Signifikanca (p)
	GG	CG	CC	
	N=74	N=14	N=4	
dPb 2006_2009 (µg/L)	81,66±69,29 N=70	150,75±119,67 N=12	46,75±38,14 N=4	0,011
ALAD_2006 (nkat/L)	374,25±185,95 N=84	327,35±133,17 N=17	196,25±56,96 N=4	0,106
lnALAD_2008 (nkat/L)	6,074±0,421 N=85	5,997±0,354 N=19	5,702±0,463 N=4	0,182
ALAD_2009 (nkat/L)	427,18±200,45 N=74	337,79±143,06 N=14	289,00±196,44 N=4	0,135
dALAD 2006_2009 (nkat/L)	-69,65±154,40 N=71	-23,00±139,02 N=12	-92,75±143,30 N=4	0,575
lnEP_2008 (µmol/L)	1,578±0,400 N=85	1,632±0,507 N=19	1,350±0,302 N=4	0,473
Hb_2008 (g/L)	138,98±11,58 N=85	144,84±10,52 N=19	135,75±10,21 N=4	0,101
cistatin C_2008 (mg/L)	0,668±0,066 N=85	0,688±0,074 N=19	0,653±0,046 N=4	0,414
lnALT (µkat/L)	-0,905±0,580 N=69	-0,800±0,659 N=18	-1,213±0,265 N=4	0,441
lnGGT (µkat/L)	-1,003±0,858 N=85	-0,887±1,032 N=19	-0,968±0,367 N=4	0,873

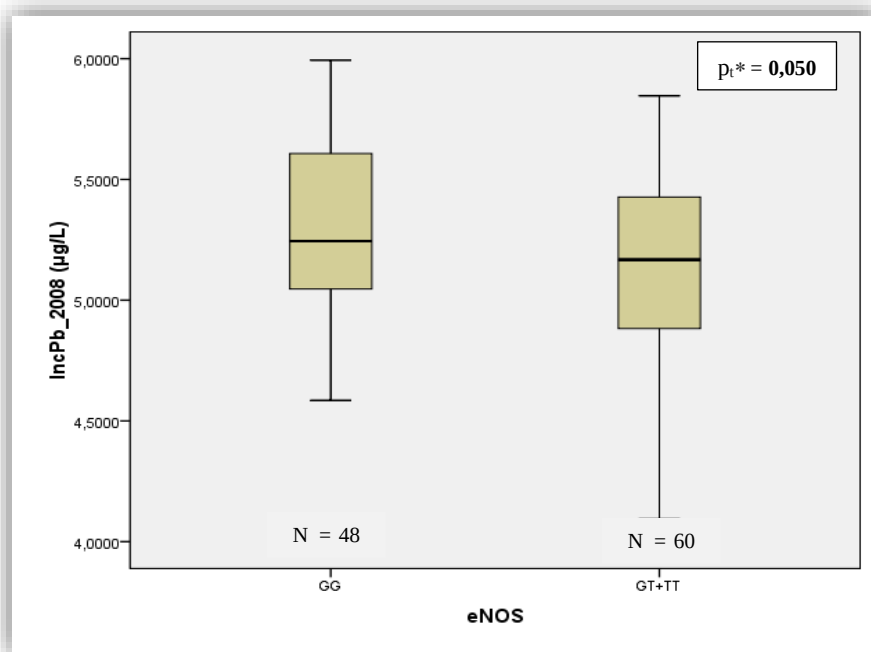
Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa Kruskal-Wallis.

Spremenljivka	N	X±SD	Signifikanca (p)
spol	112	1,710±0,454	0,943
vrsta_dela	112	44,03±0,709	0,696
Ht_2008	108	0,448±0,375	0,041
sistolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	130,25±17,09	0,622
diastolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	84,46±10,43	0,532

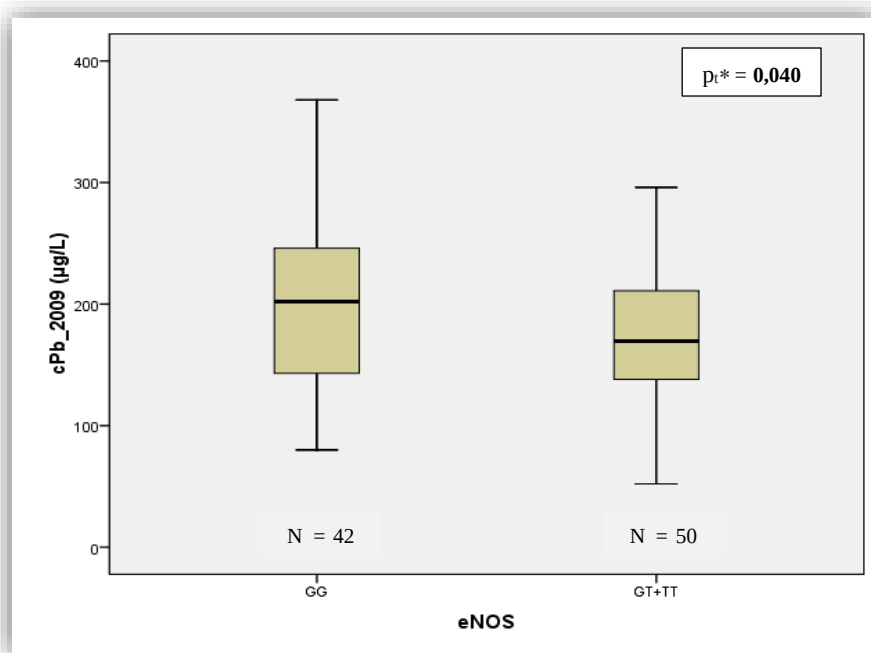
Preglednica XXIV: Rezultati statistične analize spremenljivk preiskovane skupine delavcev v okviru Post Hoc testov (Scheffe, LSD, Bonferroni).

Spremenljivka	Post Hoc test	Genotip	Signifikanca (p)
cPb_2006 (µg/L)	Scheffe	GG – CG	0,004
	LSD	GG – CG	0,001
		CC – CG	0,042
	Bonferroni	GG – CG	0,003
dPb 2006_2009 (µg/L)	Scheffe	GG – CG	0,020
		CC – CG	0,071
	LSD	GG – CG	0,005
		CC – CG	0,022
ALAD_2006 (nkat/L)	LSD	GG – CC	0,051
lnALAD_2008 (nkat/L)	LSD	GG – CC	0,080
Hb_2008 (g/L)	LSD	GG – CG	0,045

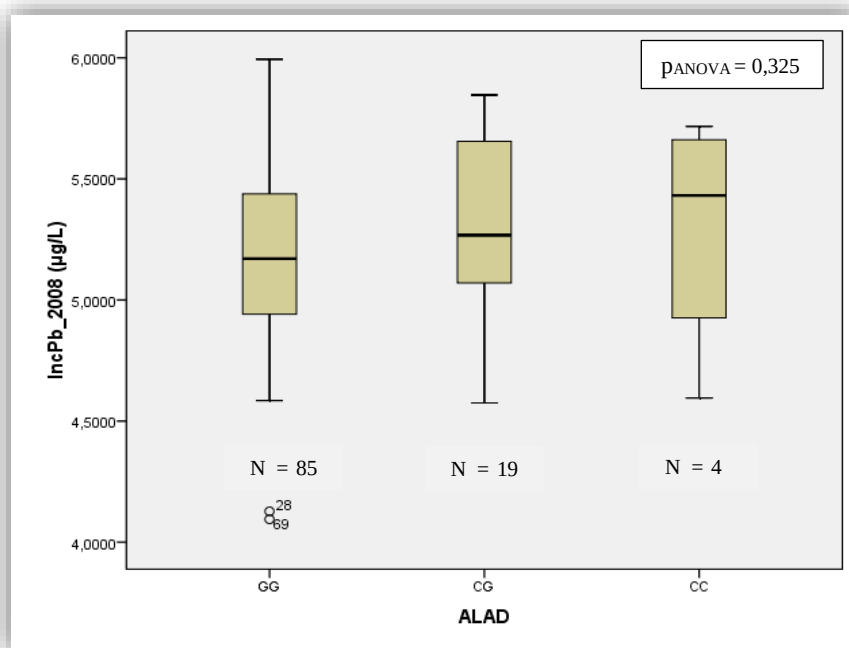
**Graf 24:** Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) koncentracije cPb_2006 glede na genotipski podskupini GG in CG+CC polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru neodvisnega t-testa (t*).



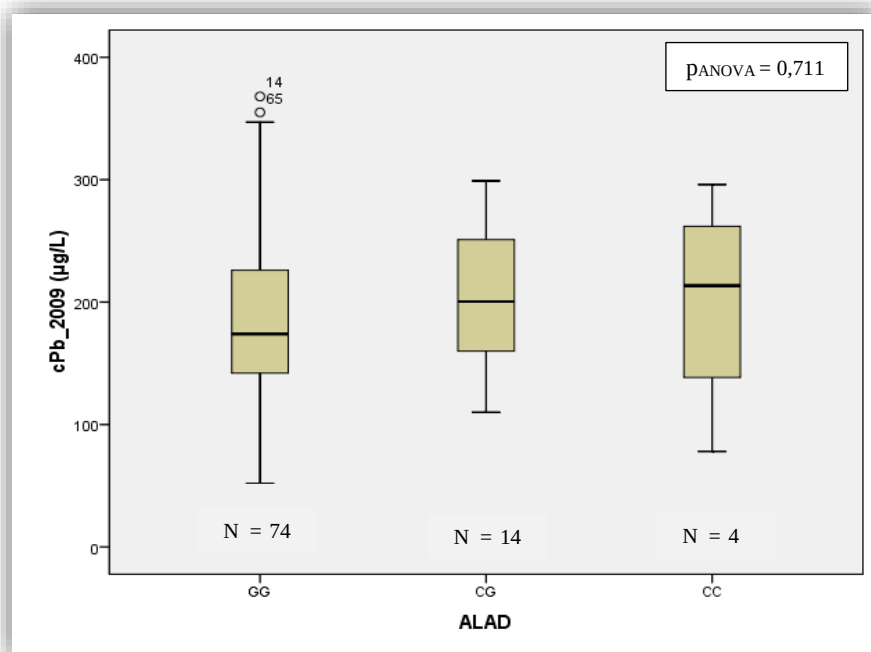
Graf 25: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije IncPb_2008 glede na genotipski podskupini GG in GT+TT polimorfizma Asp298Glu (eNOS), v okviru neodvisnega t-testa (t*).



Graf 26: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije cPb_2009 glede na genotipski podskupini GG in GT+TT polimorfizma Asp298Glu (eNOS), v okviru neodvisnega t-testa (t*).



Graf 27: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije IncPb_{2008} glede na genotipske podskupine polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).



Graf 28: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracije cPb_{2009} glede na genotipske podskupine polimorfizma Lys59Asn (ALAD), v okviru testa ANOVA (GG - nemutiran homozigot, CC - mutiran homozigot, CG - heterozigot).

7.3.3 *eNOS* (rs1799983; Asp298Glu)

Preglednica XXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa ANOVA.

Spremenljivka	X $\pm$ SD			Signifikanca (p)
	GG	GT	TT	
ln_starost (leta)	3,785 $\pm$ 0,091 N=51	3,774 $\pm$ 0,076 N= 52	3,798 $\pm$ 0,138 N= 9	0,679
leta_delovne_dobe	22,62 $\pm$ 4,738 N=50	22,21 $\pm$ 3,201 N=52	23,11 $\pm$ 5,278 N=9	0,785
cPb_2006 (μ g/L)	284,69 $\pm$ 91,41 N=48	276,73 $\pm$ 106,65 N=49	322,57 $\pm$ 140,11 N=7	0,539
lnPb_2008 (μ g/L)	5,300 $\pm$ 0,368 N=48	5,123 $\pm$ 0,396 N=51	5,327 $\pm$ 0,356 N=9	0,050
cPb_2009 (μ g/L)	203,76 $\pm$ 73,90 N=42	171,51 $\pm$ 53,99 N=43	199,29 $\pm$ 68,47 N=7	0,070
dPb 2006_2009 (μ g/L)	82,90 $\pm$ 77,67 N=39	96,27 $\pm$ 80,19 N=41	88,67 $\pm$ 109,28 N=6	0,763
ALAD_2006 (nkat/L)	330,10 $\pm$ 171,17 N=48	393,64 $\pm$ 189,18 N=50	322,86 $\pm$ 104,96 N=7	0,180
lnALAD_2008 (nkat/L)	6,059 $\pm$ 0,404 N=48	6,039 $\pm$ 0,448 N=51	6,024 $\pm$ 0,288 N=9	0,959
ALAD_2009 (nkat/L)	368,60 $\pm$ 162,22 N=42	441,14 $\pm$ 228,96 N=43	435,14 $\pm$ 107,64 N=7	0,135
dALAD 2006_2009 (nkat/L)	-68,59 $\pm$ 144,22 N=39	-54,10 $\pm$ 160,24 N=42	-107,50 $\pm$ 147,90 N=6	0,215
lnEP_2008 (μ mol/L)	1,632 $\pm$ 0,459 N=48	1,538 $\pm$ 0,374 N=51	1,530 $\pm$ 0,425 N=9	0,503
Hb_2008 (g/L)	141,81 $\pm$ 12,06 N=48	138,10 $\pm$ 11,12 N=51	139,78 $\pm$ 10,15 N=9	0,278
cistatin C_2008 (mg/L)	0,684 $\pm$ 0,065 N=48	0,659 $\pm$ 0,068 N=51	0,672 $\pm$ 0,065 N=9	0,175
lnALT (μ kat/L)	-0,866 $\pm$ 0,602 N=42	-0,895 $\pm$ 0,594 N=41	-1,076 $\pm$ 0,503 N=8	0,656
lnGGT (μ kat/L)	-0,953 $\pm$ 0,902 N=48	-0,997 $\pm$ 0,898 N=51	-1,047 $\pm$ 0,604 N=9	0,944

Preglednica XXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa Kruskal-Wallis.

Spremenljivka	N	X $\pm$ SD	Signifikanca (p)
spol	112	1,710 $\pm$ 0,454	0,912
vrsta_dela	112	44,03 $\pm$ 0,709	0,478
Ht_2008	108	0,448 $\pm$ 0,375	0,500
sistolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	130,25 $\pm$ 17,09	0,505
diastolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	84,46 $\pm$ 10,43	0,483

Preglednica XXVII: Rezultati statistične analize spremenljivk preiskovane skupine delavcev v okviru Post Hoc testov (Scheffe, LSD, Bonferroni).

Spremenljivka	Post Hoc test	Genotip	Signifikanca (p)
IncPb_2008 (μ g/L)	Scheffe	GG – GT	0,073
	LSD	GG – GT	0,022
	Bonferroni	GG – GT	0,067
cPb_2009 (μ g/L)	Scheffe	GG – GT	0,078
	LSD	GG – GT	0,024
	Bonferroni	GG – GT	0,073
ALAD_2006 (nkat/L)	LSD	GG – GT	0,079
ALAD_2009 (nkat/L)	LSD	GG – GT	0,088
cistatin C_2008 (mg/L)	LSD	GG – GT	0,063

7.3.4 PEP2_1 (rs2257212; Leu350Phe)

Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa ANOVA.

Spremenljivka	X $\pm$ SD			Signifikanca (p)
	CC	CT	TT	
ln_starost (leta)	3,772 $\pm$ 0,096 N=34	3,777 $\pm$ 0,079 N= 54	3,801 $\pm$ 0,097 N= 24	0,437
leta_delovne_dobe	21,41 $\pm$ 5,070 N=34	22,72 $\pm$ 3,319 N=53	23,42 $\pm$ 4,010 N=24	0,155
cPb_2006 (μ g/L)	280,94 $\pm$ 93,39 N=33	296,73 $\pm$ 105,16 N=51	253,95 $\pm$ 105,33 N=20	0,280
IncPb_2008 (μ g/L)	5,190 $\pm$ 0,449 N=34	5,288 $\pm$ 0,384 N=51	5,106 $\pm$ 0,264 N=23	0,155
cPb_2009 (μ g/L)	187,40 $\pm$ 69,23	200,33 $\pm$ 68,98	158,29 $\pm$ 41,30	0,081

Spremenljivka	X±SD			Signifikanca (p)
	CC	CT	TT	
	N=30	N=45	N=17	
dPb 2006_2009 (µg/L)	89,55±81,81 N=29	90,95±79,47 N=42	86,33±85,86 N=15	0,982
ALAD_2006 (nkat/L)	342,36±177,94 N=33	380,98±181,11 N=52	333,90±173,66 N=20	0,484
lnALAD_2008 (nkat/L)	6,037±0,437 N=34	6,042±0,397 N=51	6,071±0,434 N=23	0,950
ALAD_2009 (nkat/L)	360,13±173,40 N=30	427,62±202,06 N=45	438,18±208,85 N=17	0,267
dALAD 2006_2009 (nkat/L)	-27,38±127,78 N=29	-67,79±150,32 N=43	-125,53±182,50 N=15	0,122
lnEP_2008(µmol/L)	1,609±0,383 N=34	1,544±0,449 N=51	1,614±0,400 N=23	0,710
Hb_2008 (g/L)	139,09±11,65 N=34	142,14±12,15 N=51	136,09±8,816 N=23	0,099
cistatin C_2008(mg/L)	0,676±0,058 N=34	0,665±0,073 N=51	0,677±0,065 N=23	0,679
lnALT (µkat/L)	-0,871±0,565 N=27	-0,843±0,617 N=47	-1,092±0,525 N=17	0,315
lnGGT (µkat/L)	-1,013±0,870 N=34	-0,834±0,928 N=51	-1,263±0,697 N=23	0,144

Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa Kruskal-Wallis.

Spremenljivka	N	X±SD	Signifikanca (p)
spol	112	1,710±0,454	0,322
vrsta_dela	112	0,46±0,709	0,655
Ht_2008	108	0,448±0,375	0,195
sistolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	130,25±17,09	0,591
diastolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	84,46±10,43	0,899

Preglednica XXX: Rezultati statistične analize spremenljivk preiskovane skupine delavcev v okviru Post Hoc testov (Scheffe, LSD, Bonferroni).

Spremenljivka	Post Hoc test	Genotip	Signifikanca (p)
leta_delovne_dobe	LSD	CC – TT	0,068
IncPb_2008 (µg/L)	LSD	TT – CT	0,063
cPb_2009 (µg/L)	Scheffe	TT – CT	0,081
	LSD	TT – CT	0,025
	Bonferroni	TT – CT	0,076
dALAD 2006_2009 (nkat/L)	LSD	CC – TT	0,042
Hb_2008 (g/L)	LSD	TT – CT	0,036
lnGGT (µkat/L)	LSD	TT – CT	0,051

7.3.5 PEPT2_2 (rs1143672; Arg509Lys)

Preglednica XXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa ANOVA.

Spremenljivka	X±SD			Signifikanca(p)
	GG	AG	AA	
ln_starost (leta)	3,785±0,086 N=36	3,772±0,090 N= 50	3,793±0,090 N= 26	0,566
leta_delovne_dobe	21,94±4,666 N=36	22,53±3,852 N=49	23,08±3,794 N=26	0,562
cPb_2006 (µg/L)	301,71±108,04 N=35	280,36±92,22 N=47	261,18±110,90 N=22	0,333
IncPb_2008 (µg/L)	5,214±0,444 N=36	5,285±0,390 N=47	5,099±0,263 N=25	0,153
cPb_2009 (µg/L)	196,34±69,93 N=32	197,51±68,38 N=41	155,11±42,42 N=19	0,046
dPb 2006_2009 (µg/L)	93,55±97,84 N=31	81,74±54,95 N=38	100,35±95,55 N=17	0,695
ALAD_2006 (nkat/L)	332,83±161,24 N=35	399,66±206,50 N=48	316,09±114,20 N=22	0,104
lnALAD_2008 (nkat/L)	6,020±0,427 N=36	6,076±0,430 N=47	6,029±0,377 N=25	0,809
ALAD_2009 (nkat/L)	361,03±172,59 N=32	447,78±215,91 N=41	399,16±173,65 N=19	0,166
dALAD 2006_2009 (nkat/L)	-32,87±124,04 N=31	-72,59±153,42 N=39	-102,47±186,19 N=17	0,284

Spremenljivka	X±SD			Signifikanca(p)
	GG	AG	AA	
lnEP_2008 (μmol/L)	1,569±0,366 N=36	1,541±0,478 N=47	1,667±0,360 N=25	0,472
Hb_2008 (g/L)	139,50±10,77 N=36	143,21±12,61 N=47	134,20±7,84 N=25	0,006
cistatin C_2008 (mg/L)	0,684±0,065 N=48	0,659±0,068 N=51	0,672±0,065 N=9	0,414
lnALT (μkat/L)	-0,896±0,540 N=29	-0,769±0,630 N=43	-1,191±0,461 N=19	0,032
lnGGT (μkat/L)	-1,003±0,852 N=36	-0,782±0,933 N=47	-1,325±0,688 N=25	0,041

Preglednica XXXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk in rezultati statistične analize preiskovane skupine delavcev v okviru testa Kruskal-Wallis.

Spremenljivka	N	X±SD	Signifikanca (p)
spol	112	1,710±0,454	0,101
vrsta_dela	112	0,46±0,709	0,194
Ht_2008	108	0,448±0,375	0,011
sistolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	130,25±17,09	0,173
diastolični_krvni_tlak (mm Hg)	105	84,46±10,43	0,584

Preglednica XXXIII: Rezultati statistične analize spremenljivk preiskovane skupine delavcev v okviru Post Hoc testov (Scheffe, LSD, Bonferroni).

Spremenljivka	Post Hoc test	Genotip	Signifikanca (p)
cPb_2009 (μg/L)	Scheffe	AA – AG	0,066
		AA – GG	0,094
	LSD	AA – AG	0,020
		AA – GG	0,030
	Bonferroni	AA – AG	0,060
		AA – GG	0,090
lnPb_2008 (μg/L)	LSD	AA – AG	0,053
ALAD_2006 (nkat/L)	LSD	GG – AG	0,091
		AA – AG	0,068
ALAD_2009 (nkat/L)	LSD	GG – AG	0,061
Hb_2008 (g/L)	Scheffe	AA – AG	0,006

Spremenljivka	Post Hoc test	Genotip	Signifikanca (p)
	LSD	AA – AG	0,001
		AA – GG	0,069
lnALT (μkat/L)	Scheffe	AA – AG	0,032
	LSD	AA – AG	0,009
		AA – GG	0,063
	Bonferroni	AA – AG	0,026
lnGGT (μkat/L)	Scheffe	AA – AG	0,041
	LSD	AA – AG	0,012

Preglednica XXXIV: Rezultati statistične analize spremenljivk preiskovane skupine delavcev v okviru testa ANCOVA.

Spremenljivka	Kovariabla	Signifikanca <i>Lys59Asn</i>	Signifikanca <i>Asp298Glu</i>	Signifikanca <i>Leu350Phe</i>	Signifikanca <i>Arg509Lys</i>
cPb_2006 (μg/L)	spol + ln_starost + leta delovne_dobe + vrsta_dela	0,005	0,461	0,351	0,370
lnPb_2008 (μg/L)	spol + ln_starost + leta delovne_dobe + vrsta_dela	0,317	0,022	0,558	0,722
cPb_2009 (μg/L)	spol + ln_starost + leta delovne_dobe + vrsta_dela	0,817	0,031	0,417	0,199
ALAD_2006 (nkat/L)	spol + ln_starost + leta delovne_dobe + vrsta_dela	0,085	0,175	0,435	0,077
lnALAD_2008 (nkat/L)	spol + ln_starost + leta delovne_dobe + vrsta_dela	0,143	0,973	0,891	0,390
ALAD_2009 (nkat/L)	spol + ln_starost + leta delovne_dobe + vrsta_dela	0,159	0,186	0,169	0,034