

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KLEMENČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KLEMENČIČ

POVEZANOST DOLŽINE TELOMER V LEVKOCITIH S STAROSTJO IN
NAČINOM ŽIVLJENJA POMENOPAVZNIH ŽENSK

THE ASSOCIATION OF LEUKOCYTE TELOMERE LENGTH WITH AGE AND
LIFESTYLE OF POSTMENOPAUSAL WOMEN

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.. Podatke o preiskovancih in vzorce krvi smo pridobili v sodelovanju z izr. prof. dr. Tomažem Kocjanom in Kliničnim oddelkom za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Kliničnega centra v Ljubljani. Eksperimentalni del magistrske naloge je bil izveden na Katedri za klinično biokemijo.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Barbari Ostanek, mag. farm., za pomoč, potrpežljivost ter vse strokovne nasvete tako pri delu v laboratoriju kot tudi pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim sodelavcem na Katedri za klinično biokemijo, še posebej Petri Ferkov, mag. lab. biomed., za uvajanje in pomoč pri izvedbi praktičnega dela naloge.

Najlepša hvala mojim domačim in še posebno fantu Jaku in prijateljem za vse njihove spodbude pri izdelavi naloge in podporo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm..

Ljubljana, 2018

Katja Klemenčič

Sestava magistrske komisije:

Predsednik: prof. dr. Janko Kos, mag. farm.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

Član: doc. dr. Nace Zidar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	VI
ABSTRACT	VII
KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 TELOMERE	1
1.2 DOLŽINA TELOMER IN PROCESI, KI URAVNAVAJO NJIHOVO DOLŽINO.....	1
1.2.1 Skrajševanje telomer.....	2
1.2.2 Podaljševanje telomer.....	4
1.3 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH (DTL) IN NJENO MERJENJE..	5
1.4 VLOGA IN POMEN TELOMER.....	6
1.5 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH IN STARANJE.....	7
1.6 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH IN MENOPAVZA.....	9
1.6.1 Povezanost dolžine telomer s starostjo ob menopavzi	10
1.6.1 Povezanost dolžine telomer z leti mene	11
1.7 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH IN NAČIN ŽIVLJENJA	12
1.7.1 Dolžina telomer v levkocitih in debelost.....	13
1.7.1 Dolžina telomer v levkocitih in kajenje.....	13
1.7.1 Dolžina telomer v levkocitih in fizična aktivnost.....	14
2 NAMEN.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 OPIS PREISKOVANK IN PRIDOBITEV PODATKOV	17
3.2 MATERIALI, REAGENTI IN APARATURE	17
3.3 IZOLACIJA DNA S KOMPLETOM FlexiGene® DNA Kit	19
3.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLIRANE DNA	21
3.5 OCENA VELIKOSTI IZOLIRANE DNA Z AGROZNO GELSKO ELEKTROFOREZO.....	22
3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)...	24

3.7	STATISTIČNA ANALIZA	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	PREVERJANJE KONCENTRACIJE, ČISTOSTI IN VELIKOSTI IZOLIRANE DNA	30
4.1.1	Ocena koncentracije in čistosti izolirane DNA	30
4.1.1	Ocena velikosti izolirane DNA	31
4.2	DOLOČANJE RELATIVNE DOLŽINE TELOMER V LEVKOCITIH Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)	31
4.2.1	Optimizacija in testiranje pomnoževanja ali qPCR.....	31
4.2.2	Relativna kvantifikacija z metodo standardne krivulje	33
4.3	OCENA POVEZANOSTI DOLŽINE TELOMER V LEVKOCITIH S KRONOLOŠKO STAROSTJO, REPRODUKTIVNIM STARANJEM IN NAČINOM ŽIVLJENJA POMENOPAVZNIH ŽENSK	35
4.3.1	Povezanost dolžine telomer v levkocitih s kronološko starostjo.....	36
4.3.2	Povezanost dolžine telomer v levkocitih z reproduktivnim staranjem žensk	38
4.3.3	Povezanost dolžine telomer v levkocitih z debelostjo.....	41
4.3.4	Povezanost dolžine telomer v levkocitih s kajenjem.....	45
4.3.5	Povezanost dolžine telomer v levkocitih s fizično aktivnostjo.....	50
5	SKLEP.....	55
6	LITERATURA	56
7	PRILOGE	i
	Priloga A: Koncentracije in čistosti vseh izoliranih vzorcev.	i
	Priloga B: Rezultati qPCR-Cq in relativna dolžina telomer posameznih vzorcev.....	v
	Priloga C: Rezultati Shapiro-Willk testa normalne porazdelitve izbranih podatkov. S sivo so obarvani normalno porazdeljeni podatki.....	ix
	Priloga D: Rezultati povezanosti dolžine telomer v levkocitih z različnimi tipi fizične aktivnosti s pripadajočimi slikami in razporeditev v skupine različnih intenzitet.	x

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vloge telomer.	6
Preglednica 2: Dejavniki, ki so jih že povezovali z DTL.	6
Preglednica 3: Temperaturni profil pomnoževanja: levo za telomere, desno za albumin... ..	26
Preglednica 4: Reakcijska zmes za izvedbo qPCR: volumni posameznih reagentov podani na eno luknjico mikrotitrne ploščice.	27
Preglednica 5: Podatki o učinkovitosti pomnoževanja in linearnosti standardnih krivulj vsake od serij za oceno primernosti izvedbe qPCR in standardnih krivulj za izračun relativne DTL.	34
Preglednica 6: Splošne značilnosti preiskovanega vzorca slovenskih pomenopavznih žensk.	36
Preglednica 7: Rezultati testov povezanosti relativne DTL s kronološko starostjo.	37
Preglednica 8: Rezultati testov povezanosti relativne DTL s starostjo ob menopavzi.....	39
Preglednica 9: Rezultati testov povezanosti relativne DTL z leti mene.....	40
Preglednica 10: Razvrstitev preiskovank glede na ITM po kriterijih SZO.	42
Preglednica 11: Rezultati testov povezanosti relativne DTL z ITM.	43
Preglednica 12: Rezultati testov povezanosti relativne DTL z obsegom pasu.....	43
Preglednica 13: Rezultati povezanosti DTL med različnimi skupinami kadilcev.....	46
Preglednica 14: Rezultati hi-kvadrat testa 1. sklopa med skupinama zdaj nekadilci in zdaj kadilci.	47
Preglednica 15: Rezultati povezanosti DTL med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni.	51
Preglednica 16: Rezultati hi-kvadrat testa med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni.	52
Preglednica 17: Rezultati testiranja vpliva intenzitete fizične aktivnosti na DTL.	53

KAZALO SLIK IN ENAČB

Slika 1: Zgradba telomer, njihovo skrajševanje in podaljševanje.	1
Slika 2: Problem podvajanja koncev linearnih kromosomov.....	3
Slika 3: Indikatorji staranja organizma.....	8

Slika 4: Mehanizmi možne povezave fizične aktivnosti z dolžino telomer.	15
Slika 5: Krivulja pomnoževanja pri qPCR in odčitanje Cq standardov ali vzorca pri telomerah.	32
Slika 6: Krivulja pomnoževanja pri qPCR in odčitanje Cq standardov ali vzorca pri albuminu.	33
Slika 7: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL s kronološko starostjo.	37
Slika 8: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL s starostjo ob menopavzi.	39
Slika 9: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL z leti mene.	40
Slika 10: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL z ITM.	43
Slika 11: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL z obsegom pasu.	43
Slika 12: Prikaz rezultata t-testa 1. sklopa preizkušanja med skupinama zdaj nekadilci in zdaj kadilci.	46
Slika 13: Prikaz rezultata t-testa 2. sklopa preizkušanja med skupinama nikoli kadilci in kadarkoli kadilci.	48
Slika 14: Prikaz rezultata t-testa 3. sklopa preizkušanja med skupinama zdaj kadilci in nekdanji kadilci.	48
Slika 15: Prikaz rezultata t-testa med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni.	51
Slika 16: Prikaz razporeditve posameznih skupin DTL med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni: zelena fizično aktivni, modra fizično neaktivni.	52
Slika 17: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL s številom ur fizične aktivnosti/teden.	53
Enačba 1: Enačba, po kateri smo izračunali relativno dolžino telomer.	28
Enačba 2: Enačba za izračun učinkovitosti pomnoževanja preko naklona standardnih krivulj.	34

POVZETEK

Želja po podaljševanju življenja tli v ljudeh že od nekdaj. Ko so v drugi polovici dvajsetega stoletja odkrili, da so lahko telomere razlog za staranje, se je znanstvenikom odprlo novo poglavje raziskovanja, ki je obetalo veliko. Toda nadaljnje raziskovanje telomer je pokazalo, da so tovrstne strukture zelo kompleksne in da je prav takšna tudi njihova povezava s staranjem. To kompleksno tematiko raziskuje tudi ta magistrska naloga.

Glavni namen naloge je bil preučiti povezanost dolžine telomer v levkocitih s staranjem in nekaterimi dejavniki načina življenja pri skupini slovenskih pomenopavznih žensk. Kot raziskovalno izhodišče smo si zastavili hipotezo, da obstaja povezava dolžine telomer v levkocitih s kronološko starostjo, starostjo ob menopavzi, leti mene, indeksom telesne mase, obsegom pasu, kajenjem in fizično aktivnostjo v vzorcu slovenskih pomenopavznih žensk. V raziskavo smo vključili 275 pomenopavznih žensk, ki smo jim odvzeli vzorec polne krvi, iz vzorcev izolirali DNA, izmerili dolžino telomer v levkocitih z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času in s statistično obdelavo ocenili omenjene povezanosti. Tekom raziskave povezanosti med dolžino telomer in izbranimi dejavniki nismo našli, saj kljub nakazanemu negativnemu trendu povezanosti dolžine telomer v levkocitih s kronološko starostjo, leti mene, indeksom telesne mase, obsegom pasu in statusom kajenja ter pozitivnemu trendu pri fizični aktivnosti, nismo dosegli statistične pomembnosti. Mejno statistično pomembne rezultate smo dosegli le pri kronološki starosti ($p=0,077$), zdaj kadilci/nekdanji kadilci ($p=0,059$) in urah hoje na teden ($p=0,054$). Naše ugotovitve so v skladu z večino drugih raziskav, ki prav tako nakazujejo na pričakovane trende povezanosti, toda ne dosežejo statistične pomembnosti. Od vseh izbranih dejavnikov je bila najbližje statistični povezanosti kronološka starost, ki je tudi v že izvedenih študijah kazala od izbranih dejavnikov največ konsistentnih rezultatov statistične povezanosti.

Naša raziskava je še ena v vrsti raziskav, ki potrjuje kompleksnost telomer in kaže na to, da je znanja o telomerah še premalo, da bi lahko prišli do klinično pomembnih zaključkov, vendar pa zaradi nakazanih pričakovanih trendov predstavlja dobro podlago za nadaljnje raziskave. V nadaljevanju raziskovanja, bi tako ob upoštevanju še drugih dejavnikov, poleg starosti, ki vplivajo na dolžino telomer, ob povečanju velikosti preučevane populacije in izboljšanju pridobivanja podatkov o preiskovankah, lahko dosegli tudi statistično pomembne rezultate.

ABSTRACT

The desire to extend human life was always exciting. In the second half of the 20th century, when it was discovered that telomeres could be the cause of aging, new possibilities for research were opened to scientists, which promised a lot. Unfortunately, further research of telomeres has shown that these structures are very complex. Therefore, their connection to aging is also complicated. That is why we still do not fully understand their role in the organism and the potential of their use for the treatment of disease. This complex subject is studied by this master's thesis.

The aim of our research was to study the association of leukocyte telomere length with aging and certain lifestyle factors in 275 Slovenian postmenopausal woman. We have hypothesized that there is an association of leukocyte telomere length with chronological age, age at menopause, time since menopause, body mass index, waist circumference, smoking and physical activity. First, we collected the whole blood samples and isolated the DNA. Then we measured leukocyte telomere length using real time polymerase chain reaction and statistically analyzed the mentioned associations. The results did not show statistically significant association of telomere length with selected factors, despite the correctly indicated negative trend in the association of leukocyte telomere length with chronological age, time since menopause, body mass index, waist circumference, smoking status and positive trend with physical activity. Borderline statistically significant results were obtained only with chronological age ($p=0.077$), smokers / former smokers ($p=0.059$) and walking hours per week ($p=0.054$). Our findings are consisted with other studies, which also indicate the expected non-statistical significant trend of association. The closest statistical association was with chronological age, which also in other studies showed most consistent statistical results of all selected factors.

Our research is another in a series of research that confirm the complexity of the telomeres and point to too limited knowledge to achieve clinically significant conclusions. However, due to the indicated trends in expected direction, it provides a good basis for further research. If other factors were taken into account not only the impact of chronological age on the telomere length, we would probably archive statistically significant results. We can also improve the results with increasing the size of the studied population and improving the acquisition of population data.

KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS

Dolžina telomer, staranje, reproduktivno staranje, način življenja, kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času.

Telomere length, aging, reproductive senescence, lifestyle, real-time polymerase chain reaction.

SEZNAM OKRAJŠAV

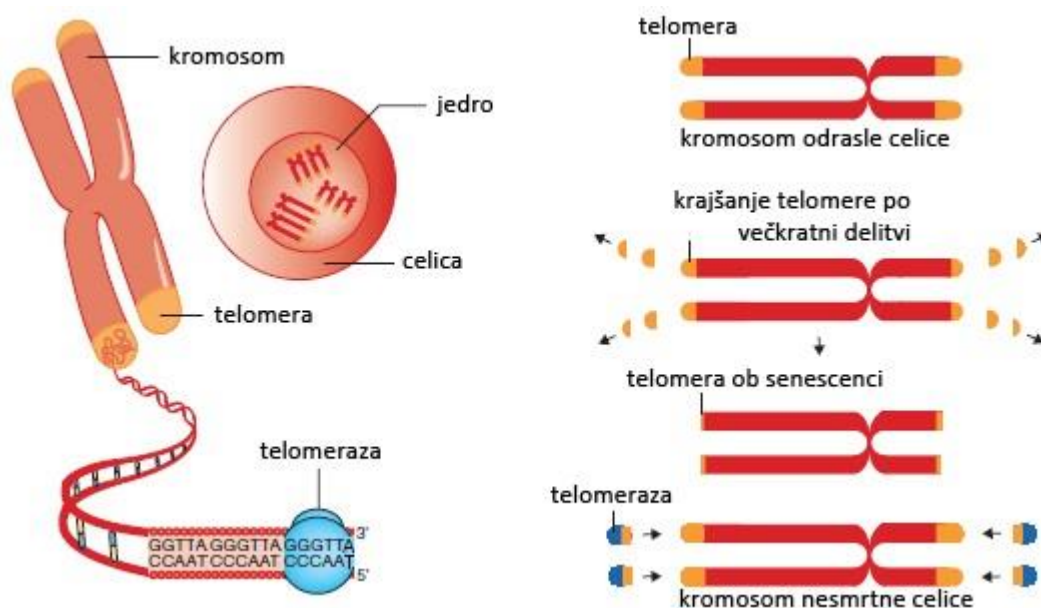
ANCOVA	analiza kovariance (angl. analysis of variance)
ANOVA	analiza variance (angl. analysis of covariance)
bp	bazni par
Cq	kvantifikacijski cikel
CVD	srčno-žilne bolezni (angl. cardiovascular disease)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DT	dolžina telomer
DTL	dolžina telomer v levkocitih
FSH	folikle stimulirajoči hormon
ITM	indeks telesne mase
kb	kilo bazni par
LH	lutenizirajoči hormon
NHT	nadomestna hormonska terapija
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RNA	ribonukleinska kislina

ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TRF	telomerna restrikcija fragmentov

1 UVOD

1.1 TELOMERE

Telomere so nukleoproteinski kompleksi na koncu linearnih evkariontskih kromosomov, sestavljene iz ponavljajočega se zaporedja nukleotidov in telomerno specifičnih proteinov (1–2). Ponavljajoči segment nukleotidov je različen glede na vrsto organizma. Pri vseh vretenčarjih, tudi človeku, telomere predstavljajo nekodirajoči del DNA s točno določeno dvojnovijačno tandemsko ponovitvijo šestih nukleotidov 5`-(TTAGGG) n -3`, ki se na 3` koncu končajo v obliki bogatega gvaninskega enovijačnega previsa (1, 3, 4). Celotna dolžina ponovitev človeških DNA heksamerov obsega od 10 do 15 kb in je odvisna od kronološke starosti, vrste tkiva in celičnega staranja. Na telomerno DNA je vezanih 6 telomerno specifičnih proteinov, ki zagotovijo njeno ustrezno prostorsko ureditev v obliki dveh zank (4–5).



Slika 1: Zgradba telomer, njihovo skrajševanje in podaljševanje [prirejeno po (6)].

1.2 DOLŽINA TELOMER IN PROCESI, KI URAVNAVAJO NJIHOVO DOLŽINO

Dolžina telomer (DT) je največja ob rojstvu človeka in v populaciji močno variira, saj ob rojstvu lahko obsega od 10 do 15 kb. Do takšne razlike pride, ker je začetna dolžina močno

dedno pogojena (okoli 80 %) in je po zadnjih podatkih odvisna od starosti obeh staršev ob spočetju (7–8). Ob rojstvu je DT pri obeh spolih enaka, z leti pa imajo v primerjavi z enako starimi moškimi daljše telomere ženske. DT je zelo dinamična in je rezultat ravnotežja med njihovim skrajševanjem in podaljševanjem.

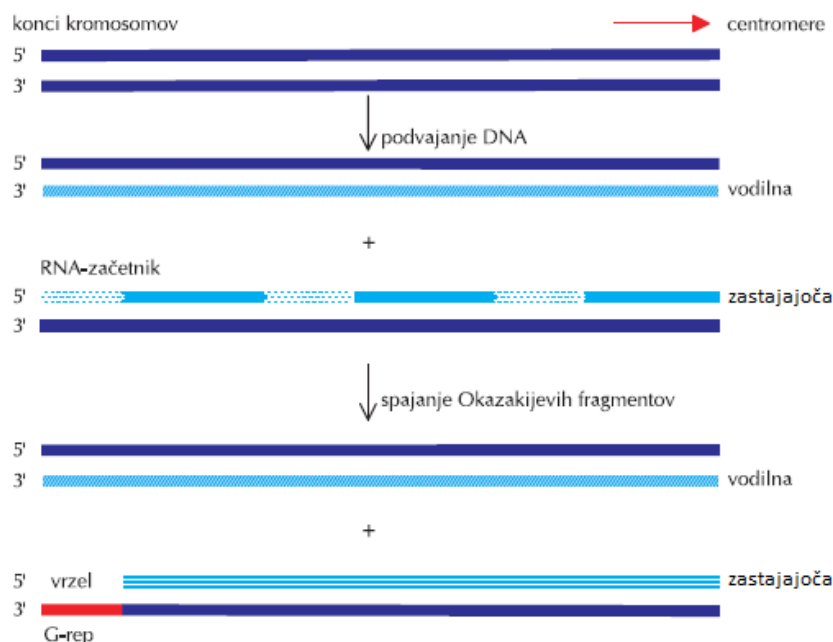
1.2.1 Skrajševanje telomer

Za normalne somatske celice obstaja meja, do katere so se zmožne podvajati, imenovana Hayflickova meja, pri kateri je DT kritično kratka. Kritično kratke telomere popravljalni mehanizmi prepoznajo kot dvojnovijačne prelome DNA, kar privede do celične senescence ali celične smrti (3, 5, 9). Celična senescenca predstavlja ireverzibilno stanje celice, ko ta preide v mortalitetni stadij 1 (M1), stopnjo celičnega cikla, v katerem se ne more več deliti, lahko pa še naprej normalno opravlja svoje delo in je še vedno presnovno aktivna (1, 3). Za normalno delovanje celičnega cikla je potrebno normalno delovanje genov p53 in Rb. Če pride do mutacije v teh genih, celica lahko prestopi M1 in se še naprej deli in po reaktivaciji telomeraze postane nesmrtna. Število celičnih delitev in življenjsko dobo celice tako določa DT, zato jo imenujemo tudi celična mitotična ura (3). Od rojstva dalje se telomere normalnih somatskih celic skrajšujejo pri vsaki celični delitvi za približno 50-200 bp zaradi problema podvajanja koncev linearnih kromosomov (2, 5) in dejavnikov, ki skrajševanje lahko pospešijo preko različnih mehanizmov, ki še niso povsem raziskani. Do sedaj sta največkrat omenjena mehanizma vnetje in oksidativni stres (10–11). Največje skrajševanje telomer je med puberteto oziroma odraščanjem, ko je delitev in diferenciacija celic najbolj pospešena, in po 20. letu postane dokaj konstantno (12–13). Telomere se različno skrajšujejo glede na vrsto tkiva, organizma in aktivnost telomeraze (1, 14).

Problem podvajanja koncev linearnih kromosomov

Proces podvajanja linearnih evkariontskih kromosomov ni popoln, saj se njihovi konci ne morejo popolnoma prepisati. Razlog je v encimu DNA-polimerazi, ki je zmožen sinteze hčerinskih verig le v smeri 5' - 3' in za začetek sinteze potrebuje začetne kratke RNA-verige imenovane oligonukleotidne začetnike s prosto hidroksilno skupino na 3' koncu. Ta pomanjkljivost DNA-polimeraze pride do izraza pri sintezi zastajajoče verige, kjer za razliko od sinteze vodilne verige sinteza poteka diskontinuirano v obliki manjših delov verige Okazakijevih fragmentov. Za sintezo vsakega izmed njih je potreben začetni oligonukleotid, ki omogoči DNA-polimerazi nadaljnjo sintezo v omenjeni smeri. Te sintetizirane fragmente

po nukleazni odstranitvi oligonukleotidnih začetkov dokončno povežeta polimeraza I in DNA-ligaza. Povežeta lahko vse fragmente razen zadnjega dela zastajajoče verige, saj zaradi odsotnosti proste hidroksilne skupine za začetek delovanja polimeraze ta ne mora zapolniti vrzeli po odstranitvi skrajnega oligonukleotidnega začetnika na 5' koncu (2, 15, 16).



Slika 2: Problem podvajanja koncev linearnih kromosomov [prirejeno po (2)].

Oksidativni stres

Oksidativni stres je glavni možen vzrok pospešenega krajšanja DT. To potrjuje večina *in vitro* študij na kultiviranih celicah, medtem ko je *in vivo* študij dosti manj, njihovi izsledki pa so bolj nekonsistentni. Kljub nekonsistentnosti več študij to tezo podpira. Oksidativni stres preko reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) povzroči oksidativno poškodbo različnih biomolekul, tudi DNA telomer. Telomere so še posebej občutljive na tovrstne poškodbe zaradi velike vsebnosti gvanina (10). Čeprav oksidativna poškodba večinoma povzroči skrajševanje DNA preko dvojno vijačnih prelomov, je pri telomerah večina te izgube rezultat poškodbe enoverižne DNA. Ker so celični popravljalni mehanizmi na območju telomer manj učinkoviti, se telomere s poškodbo enovijačne DNA v naslednji delitvi ne bodo povsem replicirale in bo prišlo do izgube celotne sekvence pred mestom te poškodbe. Enoverižne prekinitve lahko glede na njihovo mesto povzročijo tudi izgubo do 1000 bp (8, 10). ROS lahko delujejo tudi indirektno na DT preko zmanjšanja aktivnosti telomeraze. Poškodbe zaradi oksidativnega stresa lahko poleg popravljalnih mehanizmov preprečijo tudi antioksidanti (10). Kronični oksidativni stres

lahko preko kopičenja poškodovanih biomolekul v organizmu sproži tudi kronično vnetje (17–18).

Vnetje

Vsak vnetni odziv spremlja eksponentna rast števila imunskih celic, ki se ohranja preko vnetnih dejavnikov. Vnetje, še posebej kronično vnetje, preko povečanega števila replikacij hematopoetičnih matičnih celic in nadaljnje diferenciacije imunskih celic pripomore k skrajševanju telomer v imunskih celicah (11–12). Krajšanje telomer je različno glede na moč in trajanje stimulusa, ki povzroči proliferacijo imunskih celic. Določeni vnetni dejavniki in imunске celice lahko vplivajo tudi na aktivnost telomeraze (11).

1.2.2 Podaljševanje telomer

Skrajševanje telomer je kompenzirano preko dveh procesov: podaljševanje telomer z encimom telomerozo ali preko poti, ki ne vključujejo telomeraze, kot so alternativno podaljševanje telomer, telomerno kromatidna izmenjava, blokiranje T zank in aktivacija rekombinantnih procesov, ki obnovijo replikativno kapaciteto (19–20). Glavni mehanizem za podaljševanje pri sesalcih je z encimom telomerozo (20).

Telomeraza

Telomeraza je ribonukleoproteinski encimski kompleks, oziroma od RNA odvisna reverzna transkriptaza, ki lahko podaljšuje telomere na njihovem 3` koncu (1). Sestavljena je iz dveh glavnih katalitičnih podenot: telomerazne RNA Terc, ki predstavlja komplementarni del regiji 3` previsa in služi kot šablona za začetek telomerne sinteze, in telomerazne reverzne transkriptaze Tert, ki sintezo katalizira. Za delovanje je potrebna tudi molekula diskarina, proteina, ki stabilizira telomerazni kompleks (5, 20, 21). Podaljševanje se začne z vezavo 3` konca RNA na komplementarni telomerni 3` previs. 5` konec vezane RNA predstavlja matrico reverzni ranskriptazi pri sintezi komplementarnega zaporedja na 3` previsu. Nato se encimski kompleks premakne vzdolž 3` previsa in se postopek ponovi. Sinteza komplementarne verige na 5` koncu poteka klasično z DNA-polimerazo (2). Encim je v času embriogeneze aktiven v večini celic, tudi somatskih. Njegova aktivnost je obratno sorazmerna z diferenciacijo tkiv in se po rojstvu zmanjša v večini celic, ohrani pa se le v kličnih celicah, ki preko telomeraze vzdržujejo nespremenjeno dolžino telomer. V normalnih odraslih somatskih celicah je večinoma ni, se pa nahaja še v nekaterih drugih odraslih celicah kot so proliferacijske celice

regenerativnih tkiv (npr. kožne celice, hematopoetične celice) in matičnih celicah (2–3). Za razliko od normalnih celic so ugotovili, da je v večini rakavih celic telomeraza reaktivirana. Telomernost aktivnost omogoča, da celica preide senescenco ali telomerno krizo in je pomembna pri iniciaciji tumorigeneze preko stabilizacije telomerne dolžine (2). Njena aktivnost je odvisna od ekspresije katalitičnih podenot, preko transkripcijskih dejavnikov in hormonov, ki se lahko vežejo na promotor gena podenote Tert, od podvrženosti proteina Tert posttranslacijskim modifikacijam, od metilacije promotorja gena za Tert in metilacije ter acetilacije histonov (9).

1.3 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH (DTL) IN NJENO MERJENJE

Za ugotavljanje *in vivo* povezanosti DT z različnimi karakteristikami preiskovancev v večini študij vretenčarjev uporabljajo merjenje dolžine telomer v levkocitih (DTL). To merjenje uporabljajo, ker je najbolj neinvaziven in klinično uveljavljen način za pridobivanje bioloških vzorcev, iz katerih dolžino lahko merijo, odvzem krvi (8). Kri je mešanica različnih krvnih celic, med katerimi so najštevilčnejši eritrociti. Ker človeški eritrociti nimajo jedra, lahko DT v krvi določamo le v levkocitih. Levkociti so zelo heterogena skupina celic z različnim izvorom, imunsko funkcijo, proliferacijskimi vzorci in telomernostjo (8, 22), kar lahko predstavlja problem, saj te razlike lahko vplivajo na povprečno DTL in razlike v DTL med študijami (8). Kljub temu, da so nekateri avtorji predlagali, da lahko DTL služi kot nadomestni označevalec za relativno dolžino telomer v drugih tkivih (23–24), merjenje DTL lahko predstavlja problem, saj ni jasno do kam sega njena povezanost z drugimi tkivi (14). Vprašanje, ali lahko DT v levkocitih uporabimo za napoved v vseh tkivih, je tako še vedno odprto. Po vsej verjetnosti je DT bolj povezana s sistemi, ki jih levkociti uravnavajo (imunski in kardiovaskularni sistem), in bi bilo zato bolj smotrno raziskovanje sprememb pri točno določenem tkivu, s katerim je ta sprememba povezana. Takšno raziskovanje je zelo redko, saj je odvzem tkiv velikokrat invaziven proces (24).

Za merjenje DT so razvite 4 metode, med katerimi za zlati standard velja telomerna restrikcija fragmentov (TRF), ki vključuje restrikcijo z encimom, elektroforezo in prenos po Southernu. S to metodo določimo absolutno DT (8, 22, 25). Najbolj uporabljena metoda je verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR), predvsem zaradi enostavnosti, majhne količine potrebnega vzorca in ker je do sedaj najbolj časovno in cenovno učinkovita metoda (26–27).

1.4 VLOGA IN POMEN TELOMER

Ključna naloga telomer je vzdrževanje genomske stabilnosti celic in določevanje njihovega potenciala podvajanja preko različnih vlog, ki so predstavljene v Tabeli 1. Vloga telomer na celičnem nivoju je dosti bolj razumljena kot njihova vloga v večceličnih organizmih (9, 22). Pri preučevanju skrajševanja telomer in njihove vloge v organizmu so prišli do spoznanj, da je skrajševanje DTL lahko odvisno tudi od različnih genetskih, okoljskih in drugih dejavnikov ter bolezni. V Tabeli 2 so naštetih dejavniki, ki so jih že povezovali z DTL. Rezultati različnih raziskav povezovanja istega dejavnika z DTL ne kažejo konsistentnosti. Do sedaj je bila ugotovljena največja konsistentnost le pri povezavi krajše DTL s povečano kronološko starostjo, moškim spolom in belo raso (8).

Preglednica 1: Vloge telomer [povzeto po (1, 2, 8, 9)].

VLOGE TELOMER	Preko skrajševanja pri vsaki celični delitvi ščitijo pred nekontrolirano delitvijo celic.
	Omejujejo neizogibne, vgrajene napake pri podvojevanju in ščitijo kodirajočo DNA pred oksidativnimi spremembami, ki so pogoste na območju telomer. Ker so telomere nekodirajoči deli DNA, te napake/spremembe niso odločilne za preživetje organizma.
	Ščitijo pred homologno in nehomologno rekombinacijo, fuzijo, degradacijo kromosomov in nepravilno aktivacijo popravljalnih mehanizmov preko vezanih proteinov, s katerimi spremenijo prostorsko ureditev tako, da omogočajo ločevanje med konci kromosomov in naključnimi prelomi DNA ali onemogočijo dostop popravljanim mehanizmom ali telomerazi.
	Vzdržujejo ustrezno strukturo celičnega jedra, saj predstavljajo pritrdilne točke za jedrni matriks.

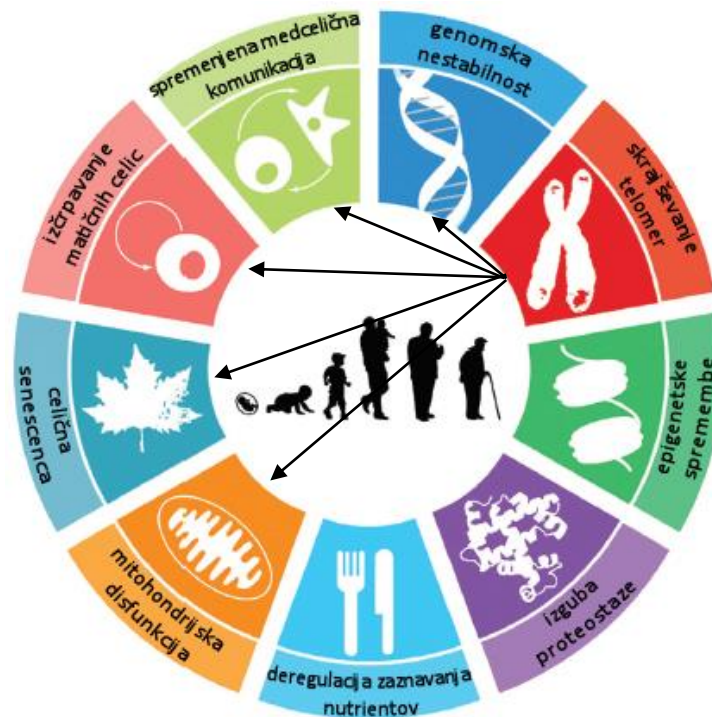
Preglednica 2: Dejavniki, ki so jih že povezovali z DTL.

GENETSKI	Mutacije v genih za telomerno specifične proteine (mutacija TIN2 za protein TIN2), mutacije genov v popravljalnih mehanizmih (Bloom, Werner sindrom), mutacije v genih telomeraze (TERC, TERT, DKC1 za diskerin) (5, 9).
OKOLJSKI	Kajenje, alkohol, fizična aktivnost, socioekonomski status in izobrazba, kronični stres, nadomestna hormonska terapija, zakonski status, debelost, dodatki vitaminov/antioksidantov, stres v otroštvu (1, 8, 9, 13, 24, 28).
BOLEZNI, BOLEZENSKE MOTNJE IN STANJA	Sladkorna bolezen tip 2, sladkorna bolezen tip 1, diabetes mellitus, hipertenzija, ateroskleroza, kardiovaskularne bolezni, popuščanje srca, možganska kap, miokardni infarkt, katarakta, demenca, alzheimerjeva bolezen, umrljivost, rak, osteoporoza, avtoimunske bolezni (lupus, revmatoidni artritis, skleroza, atopični dermatitis, psoriaza), depresija, infektivne bolezni (1, 5, 8, 9, 13, 19, 24, 25).
DRUGO	Spol, rasa, starost, reproduktivna starost, epigenetske modifikacije, starost staršev ob spočetju (6, 8, 29).

1.5 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH IN STARANJE

V razvitih državah je že skoraj dve stoletji zaznati trend daljšanja pričakovane življenjske dobe in večjega deleža starejše populacije. Zaradi staranja je populacija vedno bolj izpostavljena upadu primarnih fizioloških funkcij, česar posledica so bolezni staranja. Za učinkovit boj proti le-tem so pomembne raziskave, ki omogočajo čim hitrejše odkrivanje in tarčno zdravljenje bolezni (1, 6). Preučevanje staranja je največji napredek doživelo z odkritjem, da je hitrost staranja kontrolirana, vsaj do nekega obsega, preko genetskih poti in biokemijskih procesov. Preučevani indikatorji staranja organizma so prikazani na Sliki 3, med njimi je tudi skrajševanje telomer, ki je povezano tudi z nekaterimi drugimi navedenimi indikatorji (6). Vse te povezave, so bile ugotovljene s preučevanjem na živalih, npr. miših, deloma tudi na ljudeh, in predstavljajo možne mehanizme povezave telomer s staranjem človeka. Večino znanja o mehanizmih povezanosti telomer s staranjem človeka so podale raziskave raka in genetskih bolezni prezgodnjega staranja, ki so posledica mutacij v popravljalnih mehanizmih DNA in vzdrževanju telomer (Wernerjev sindrom, Bloom sindrom, ataksija teleangiektazija, kongenitalna diskeratoza) ter mutacij v telomernih proteinih (aplastična anemija, kongenitalna diskeratoza) (6, 20).

Ostalo znanje o povezanosti človeškega staranja s telomerami pa podajajo raziskave povezanosti dolžine telomer v levkocitih z različnimi indikatorji staranja človeka, ki jih lahko povzamemo v naslednje ugotovitve. Pomembna izsledka presečnih študij sta, da se DTL skrajšuje z večjo kronološko starostjo človeka, in da je pri ljudeh enake starosti prisotna velika interindividualna variabilnost v dolžini telomer v levkocitih (13, 24). Longitudinalne raziskave pa so ugotovile, da je prisotna velika interindividualna variabilnost v stopnji skrajševanja telomer različnih starostnih populacij, da je hitrejša stopnja skrajševanja do 20. leta, nato dokaj stalno skrajševanje in da je skrajševanje telomer proporcionalno začetni DT (8, 13, 19). Ostale raziskave različnega tipa pa ugotavljajo, da DTL lahko predstavlja kumulativno izpostavljenost človeka oksidativnemu stresu in vnetju (dvema glavnima mehanizmoma v patologiji bolezni staranja) preko celega življenja (12, 19, 30), da je skrajševanje DTL pospešeno pri nekaterih boleznih staranja (21, 25), da so krajše telomere in večja stopnja skrajševanja lahko povezani z večjo umrljivostjo zaradi kateregakoli vzroka ali z umrljivostjo, povezano z določeno boleznijo (8, 24), in da so krajše telomere povezane z upadom zmanjšanja fizičnih in kognitivnih funkcij (8, 24) ter manjšim številom let zdravega življenja (21).



Slika 3: Indikatorji staranja organizma [prirejeno po (6)].

Na podlagi povezanosti DTL z nekaterimi sindromi prezgodnjega staranja, nekaterimi boleznimi staranja, tveganjem za umrljivost, nekaterimi starostnimi upadi funkcij in dejstvom, da se telomere skrajšujejo s kronološko starostjo in da je prisotna velika interindividualna razlika v DTL, je DT bila predlagana tudi za biološki označevalec staranja (8, 21, 24). Biološki označevalci staranja so kvantitativni parametri, ki bolj odsevajo biološko staranje kot kronološka starost, saj kronološka starost ni najboljše merilo za posameznikovo funkcionalnost in zdravje. Z njimi lahko identificiramo tako bolezni staranja kot tudi spremljamo njihov razvoj ter določimo tveganje za umrljivost (24). Ker vse našete povezave, razen navedenih dejstev (skrajševanje dolžine telomer v levkocitih s povečano kronološko starostjo in prisotnost velike interindividualne razlike v njihovi dolžini), niso konsistentne med različnimi raziskavami in ker nimamo enotnega kriterija za določevanje bioloških označevalcev staranja, je še danes odprto vprašanje, ali dolžino telomer lahko štejemo za biološki kazalec staranja. Glede na trenutne raziskave verjetno ni univerzalen biološki označevalec staranja človeka, ki bi identificiral tveganje za vse bolezni staranja (8, 24). V zvezi z DT kot biološkim označevalcem ostajajo odprta tudi številna druga vprašanja, kot so naslednja: ali so skrajšane telomere posledica ali vzrok bolezni staranja, kako najbolje razločevati med posledicami bolezni in posledicami staranja na DT in katera meritev DT

(srednja DTL, najkrajše telomere, njihovo spreminjanje skozi čas) je najbolj informativna (24). Dokončni odgovor na to, ali je DT biološki označevalec, ki ima lahko tudi klinični pomen v odkrivanju bolezni staranja, bomo dobili s študijami, ki bodo podale več informacij o telomerni dinamiki tekom človeškega življenja in dinamiki odnosa DT s starostjo upadajočih funkcij in z napredkom v raziskovanju genoma (19, 24).

1.6 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH IN MENOPAVZA

Menopavza je zadnja menstruacija v življenju, kateri vsaj 12 mesecev ni sledila nobena druga menstruacija. Starost žensk ob pojavu menopavze je različna. V razvitem svetu je povprečna starost žensk ob koncu njihovega reproduktivnega obdobja 52 let. Če se menopavza pojavi pred 40. letom, jo označujemo za prezgodnjo, zgodnja pa je pred 45 letom. Z menopavzo ženske vstopijo v pomenopavzno obdobje (29, 31, 32). S tem obdobjem so povezane hormonske spremembe: zvišanje folikle stimulirajočega hormona (FSH) in lutenizirajočega hormona (LH) ter padec anti-Mullerjevega hormona in estrogenov, ki povzročijo menopavzne spremembe (32). Čeprav so najbolj znane spremembe vročinski oblivi, psihične spremembe in spremenjena nožnica, so iz klinične perspektive pomembnejše predvsem dolgoročne spremembe, ki imajo največje posledice za kakovost in trajanje življenja žensk (31).

Populacija pomenopavznih žensk zaradi številnih menopavznih sprememb ni zanimiva le za preučevanje povezanosti tveganja za srčno-žilne bolezni (CVD) in osteoporozo s koncentracijami endogenih in eksogenih estrogenov in uporabnosti nadomestne hormonske terapije (NHT). Pomembna je tudi za proučevanje teh sprememb in zdravstvenih tveganj z DT. Večina epidemioloških raziskav vpliva estrogenov je prišla do dveh spoznanj: da imajo ženske z nižjimi koncentracijami endogenih estrogenov večje tveganje za CVD in da NHT zmanjša tveganje za te bolezni (33). Ker ta spoznanja iz epidemioloških raziskav niso bila potrjena pri večini kliničnih raziskav, so upali, da jim bodo nekaj jasnejših odgovorov o *in vivo* vlogi estrogenov podale raziskave DT. Glavni dejavnik tveganja za razvoj tako CVD kot osteoporoze je starost, in ker se s starostjo DTL zmanjšuje, ni presenetljivo, da so v nekaterih raziskavah povezali krajše telomere s povečanim tveganjem za CVD in osteoporozo (13). Ker se tveganje za te bolezni po menopavzi s spremembo koncentracije estrogenov še poveča neodvisno od starosti, so krajše telomere skušali povezati tudi s hitrejšim pojavom menopavze in z njo povezano nižjo koncentracijo estrogenov preko več načinov. V nekaterih raziskavah so primerjali DT pred in po pojavu menopavze (34), povezovali DT z starostjo ob menopavzi

(29, 35, 36), s številom let preteklih od menopavze do odvzema vzorca (leta mene) (18), starostjo ob prvi menstruaciji (17–18), plodnostjo (37) in pri drugih gledali vpliv let izpostavljenosti endogenemu estrogenu (preko razlike starosti ob menopavzi in ob menarhi) (17) in eksogenemu estrogenu (trajanje NHT) (17, 18, 38) na DT. Možen mehanizem teh vplivov je *in vitro* dokazana stimulacija aktivnosti telomeraze z estrogeni (36, 38, 39, 40). Če estrogeni tudi *in vivo* povečajo aktivnost telomeraze in ta učinek po menopavzi zaradi njihovega pomanjkanja izostane, se preko zmanjšanja estrogenske stimulacije telomeraze poveča tveganje z estrogeni povezanih bolezni. Tako lahko pričakujemo, da bodo imele ženske pred menopavzo daljše telomere kot po menopavzi. Kljub tem logičnim predpostavkam izsledki naštetih raziskav velikokrat kažejo drugače. Presenetljivi so predvsem izsledki raziskav, ki kažejo, da je skrajševanje telomer hitrejše v premenopavznih ženskah kot pomenopavznih (34), in da je daljša izpostavljenost endogenim estrogenom povezana z daljšimi telomerami in nižjo aktivnostjo telomeraze (17). Raziskave ne izključujejo tudi možnosti, da so za spremembe v menopavzi lahko bolj ključne druge hormonske spremembe (npr. povišanje FSH), in da je nekonsistentnost med dosedanjimi rezultati raziskav del meritvenih napak. Meritvenih napak povezanih predvsem z merjenjem DT v eni časovni točki, ki ne upošteva individualno specifičnih vzorcev koncentracij estrogenov in FSH med prehodom v menopavzo (33).

V populaciji pomenopavznih žensk so DT preučevali tudi v zvezi z osteoporozo (41), Downovim sindromom (42), diabetesom (43), rakom dojk (44, 45), debelostjo (40, 46, 47), tveganjem in umrljivostjo za CVD (48, 49), kognicijo (17), prehrano (46, 37), razliko med spoloma (34), fizično aktivnostjo (46, 50) in dednostjo DT (37).

1.6.1 Povezanost dolžine telomer s starostjo ob menopavzi

Starost ženske ob menopavzi je starost ženske, pri kateri zaradi katerega koli razloga menstruacija dokončno izostane in predstavlja ireverzibilen konec ženskega reproduktivnega življenja (51). Po definiciji naravnega nastanka menopavze menopavza nastane zaradi usihanja rezerv foliklov v jajčniku (32). Na usihanje imajo vpliv na celičnem nivoju različni notranji (rasa, genetske predispozicije) in zunanji dejavniki (ginekološki, kirurški posegi, kemo in radio terapije, kajenje, debelost, endokrini motilci hipotalamično-hipofizno-ovarijske osi) (31, 32, 51). Na usihanje rezerve in posledično starost žensk ob menopavzi pa lahko vpliva tudi DT in telomerazna aktivnost v jajčnikih. Začetno število foliklov v jajčniku *in*

utero razvijajočega se ploda je odvisno od števila izvornih spolnih celic, ki so prišle na mesto razvijajočih jajčnikov, in njihove zmožnosti delitve. Ker je DT indikator replikacijske zmožnosti somatskih celic, lahko sklepamo, da je DT eden izmed dejavnikov, ki določajo zmožnost delitve teh celic. Preko tega lahko DT vpliva na dolžino reproduktivnega časa, saj DT žensk iste starosti odseva različno DT izvornih spolnih celic ženskega plodu, razlika v njihovi dolžini pa število delitev izvornih spolnih celic (32, 51). DT je tako lahko ne samo označevalec replikativnega staranja somatskih celic, ampak s povezavo starosti ob menopavzi tudi označevalec reproduktivnega staranja žensk (29, 35). Tako je pomembna v raziskavah neplodnosti ali zmanjšane plodnosti, pri tistih z neuspešnimi umetnimi oploditvami, večkratnimi spontanimi splavi in prirojenimi boleznimi neplodnosti (29, 52) ter sindromih pospešenega staranja, ki so tudi velikokrat povezani z neplodnostjo ali zgodnjo menopavzo. Trenutni izsledki raziskav o povezavi reproduktivnega staranja preko starosti ob menopavzi in DT so si nasprotujoči, saj nekateri kažejo na povezavo daljših telomer z višjo starostjo ob menopavzi (17, 29, 51), druge pa ne (37, 45, 53). Na to povezavo ima velik vpliv rasa oziroma etničnost (daljše telomere, večja starost ob menopavzi pri belkah in obratno pri nebelkah) (17, 29, 35, 36, 51). Ugotovili so tudi, da starost ob menopavzi močno pozitivno korelira tudi s starostjo matere in očeta ob spočetju, kar kaže na močan genetski vpliv (37). DT preučujejo v povezavi s starostjo ob menopavzi tudi pri Downovem sindromu (42) ali boleznih kot sta raka dojke (45) in maternice (53), za katere je značilen zgodnejši ali poznejši pojav menopavze, ter CVD in osteoporozi, pri katerih je njihova večja pojavnost povezana s zgodnejšo menopavzo. Vse te raziskave, tudi raziskave povezanosti starosti ob menopavzi in DT, zaradi rezultatov, ki niso skladni, zaenkrat ne potrjujejo DT kot samostojnega označevalca reproduktivnega staranja.

1.6.1 Povezanost dolžine telomer z leti mene

Tovrstna povezanost je pri človeku zelo malo raziskana, saj smo našli le 2 članka, ki sta jo opisovala. Prvi je leta mene želel uporabiti kot spremenljivko pri multivariantnem preučevanju vpliva genetskih dejavnikov, vpletenih v presnovo estrogenov in izpostavljenosti eksogenim estrogenom na DTL (18). Drugi pa je leta mene uporabil za ločevanje učinka starosti in starostno odvisnega zmanjšanja endogenih estrogenov na DT. V nobeni od raziskav niso našli statistično značilne povezave (17). Preučevanje let mene je smiselno predvsem zaradi nedavnih izsledkov, da vse ženske med prehodom v menopavzo ne izkusijo enakega padca koncentracije estrogenov in dviga FSH. Našli so 4 različne vzorce padca estrogenov in

3 različne vzorce dviga FSH. Poleg tega koncentracije estrogenov in FSH po menopavzi lahko variirajo glede na čas, ki je pretekkel od menopavze (33). Če imajo estrogeni tudi *in vivo* vlogo, da sorazmerno s svojo koncentracijo povečujejo aktivnost telomerase, bi tudi leta mene lahko imela preko različnih vzorcev padca estrogenov vpliv na DT. Posledično bi lahko bila leta mene vzrok nekonsistentnosti dosedanjih raziskav povezanosti estrogenov ali DT s tveganjem za CVD. Vzrok nekonsistentnosti je lahko tudi pri raziskavah vpliva NHT na DT, saj so tudi te predpostavljale isti vzorec padca estrogenov. Ni nujno, da so vzorci padca estrogenov tisti, ki bi lahko rešili vprašanja neskladnosti, lahko bi bili to tudi vzorci dviga FSH (54–55).

1.7 DOLŽINA TELOMER V LEVKOCITIH IN NAČIN ŽIVLJENJA

Pomembnost zdravega načina življenja se kaže v zmanjševanju tveganja za razvoj kroničnih bolezni, ki so vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti v razvitem svetu. Mehanizem te povezave je zmanjševanje oksidativnega stresa in kroničnega vnetja, ki sta vpletena v patologijo večine kroničnih bolezni (56–57). Kronično vnetje in oksidativni stres pa skrajšujeta tudi telomere. Ker skrajševanje telomer odseva kumulativno izpostavljenost vnetju in oksidativnemu stresu preko celotnega človeškega življenja (12, 19) in so krajše telomere povezane z večjo kronološko starostjo (13), ki je glavni dejavnik tveganja za razvoj najpogostejših kroničnih bolezni, so tudi dejavniki zdravega načina življenja lahko povezani z DT. Dejavniki načina življenja, ki so bili raziskani v povezavi s telomeri so: debelost, fizična aktivnost, kajenje, prehrana, stres in socialno-ekonomski položaj. Pri prehrani so ugotavljali povezanost posameznega živila (tako zdravega/nezdravega) in vitaminov z DT (30) in vplive diet na stopnjo skrajševanja DT (39, 58). Pri stresu so ugotavljali vpliv psihološkega stresa (59), kroničnega stresa (60), stresa v otroštvu (28, 61) na DT (28, 60, 61). V sklopu socialno-ekonomskih dejavnikov so npr. ugotavljali vpliv izobrazbe na DT (37, 60). Raziskuje pa se tudi skupen vpliv več dejavnikov na DT (46, 57). Raziskave debelosti, fizične aktivnosti in kajenja z DT so predstavljene v nadaljnjih poglavjih. Na splošno je povezanost DT z debelostjo, fizično aktivnostjo, kajenjem in stresom veliko bolj raziskana kot s prehrano in socialno-ekonomskim položajem. Večinoma gre za presečne študije na odrasli populaciji. Sistematični pregledi in meta analize nakazujejo, da je prisoten trend povezanosti debelosti, neredne telesne aktivnosti, kajenja, nezdrave prehrane, stresa in slabšega socialno-ekonomskega statusa s krajšimi telomerami, a da je v raziskavah velikokrat nesignifikanten ali pa je signifikantna povezava šibka (58–64).

1.7.1 Dolžina telomer v levkocitih in debelost

Debelost je kronična bolezen s čezmernim kopičenjem maščevja v telesu, katere razširjenost je skoraj epidemična v razvitem svetu tako med odraslimi kot otroci. Pri otrocih je znano, da debelost poveča tveganje za CVD, medtem ko jo pri odraslih štejemo za pomemben dejavnik tveganja za razvoj sladkorne bolezni tipa 2, hipertenzije, ateroskleroze in raka (65–66). Velikokrat jo spremlja povečano tveganje za umrljivosti in slabša kvaliteta življenja. Dodatno poslabšujeta kvaliteto življenja tudi nočna apneja in neplodnost (67). Mehanizma nastanka bolezni, povezanih z debelostjo, sta verjetno povečano vnetje (68), ki nastane zaradi motenj adipocitnega izločanja citokinov (leptin, adiponektin IL-6, TNFa), in oksidativni stres (67). Ker sta prav vnetje in oksidativni stres tudi mehanizma za pospešeno skrajševanje telomer, sta lahko debelost in DT vzročno povezani (64–65). Največji do sedaj narejeni literaturni pregled nakazuje trend obratne povezanosti, a opozarja na veliko heterogenost rezultatov (tretjina študij ni našla povezave) in šibko do srednje močno povezanost v študijah, ki so to povezavo našle (64). Heterogenost je prisotna tudi pri povezovanju vnetnih mediatorjev z debelostjo, kar nakazuje na drug možen mehanizem povezanosti, kot je mutacija genov (65, 69). Ugotovili so, da se povezanost lahko spreminja glede na spol (70), starost (71), etničnost (69), menopavzni status (66), trajanje debelosti (72) in stopnjo debelosti (73). Za povezavo debelosti z DTL se uporabljajo različni indikatorji debelosti. Najpogosteje uporabljen je indeks telesne mase (64, 66, 69, 74). Dosti manj raziskav uporablja druge indikatorje: obseg pasu (64, 66, 69, 74), pasno-kolčno razmerje (66, 69, 74), pasovno-višinsko razmerje (66, 70) adipoznost (69) oziroma % maščobe (66). Povezanost so preiskovali tudi preko snovi, ki vplivajo na ješčnost: leptin, adiponektin (74) in grelin (73).

1.7.1 Dolžina telomer v levkocitih in kajenje

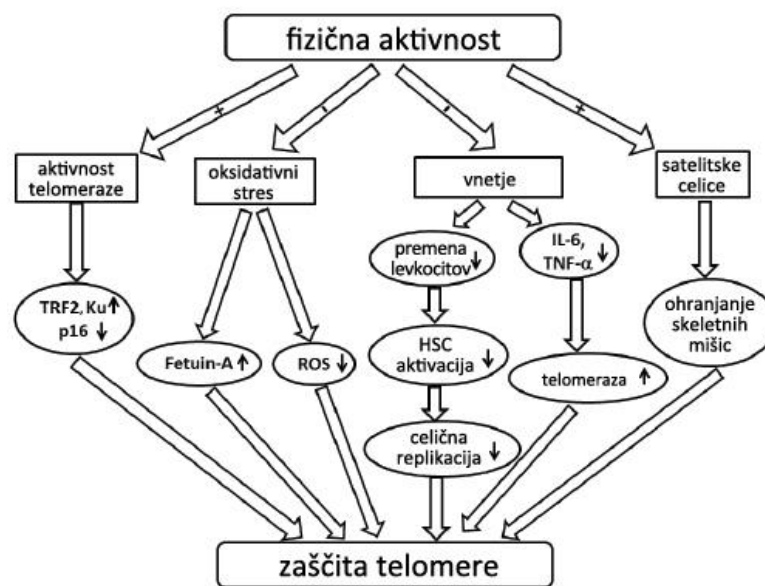
Kajenje zaradi svoje razširjenosti predstavlja vedno večji svetovni problem javnega zdravja (75). Je eden od najpomembnejših dejavnikov tveganja za razvoj CVD (ateroskleroza, diabetes), številnih rakov (ezofagealni, gastrični, pljučni) in bolezni dihal ter je povezan s prezgodnjo umrljivostjo kadičev s temi boleznimi (76–78). Kajenje tobaka je škodljivo zaradi oksidativnih, karcinogenih snovi in prostih radikalov v vdihanem dimu, ki lahko neposredno ali posredno preko svojih metabolitov (ROS) ali aktivacije makrofagov povzročijo ali pospešijo oksidativni stres in/ali vnetje v organizmu (77). Vplivajo tudi na zaloge antioksidantov (78). Ker sta tako oksidativni stres s poškodbo DNA kot vnetje tudi glavna

opisana mehanizma za pospešeno skrajševanje telomer, lahko sklepamo, da lahko kajenje pospeši krajšanje telomer in preko skrajšanih telomer pospeši proces biološkega staranja in poveča tveganje za razvoj bolezni staranja (76). Povezanost kajenja in DT *in vivo* so raziskovali preko primerjanja DTL med kadilci, nekdanjimi kadilci in nekadilci. Med nekdanjimi kadilci so raziskovali tudi vpliv časa abstinence na DT (62, 76, 79). Raziskovali so tudi vpliv intenzitete kajenja na DT, predvsem preko števila pokajenih paketkov cigaret/leto in števila pokajenih cigaret/dan (62, 76, 77, 79) in koncentracije serumskega metabolita nikotina kotinina (76–77), ki je pomemben za objektivno oceno izpostavljenosti zaradi različnega načina kajenja (razlika v številu vdihov/pokajeno cigareto in volumnu vdiha). Novejše raziskave, ki povezanost raziskujejo preko vpliva kajenja na aktivnost telomeraze preko spreminjanja prostorske ureditve telomer (80) in vpliva kajenja na metilacijo genov, povezanih s krajšo DT (81), kažejo tudi na druge možne mehanizme te povezave. Največji do sedaj narejeni pregled podaja, da več raziskav podpira trditvi, da imajo najdaljše telomere nekadilci, sledijo jim nekdanji kadilci, najkrajše pa imajo kadilci in da je prisotna šibka obratna povezanost med intenziteto kajenja in DT. Navaja tudi, da je največ raziskav, ki potrjuje povezavo, presečnih in da je večina raziskav narejenih na podatkih samoocenjevanja preko vprašalnikov. Najpogostejša metoda ocenitve dolžine telomer je qPCR iz vzorca periferne krvi. Opisano je tudi merjenje v slini, ki pa je dokaj redko (62, 79). Čeprav večina raziskav kaže na trend povezanosti, raziskovalci še ne izključujejo možnosti, da morda te povezanosti ni, in da so posamezniki s krajšimi telomerami lahko bolj nagnjeni h kajenju (82).

1.7.1 Dolžina telomer v levkocitih in fizična aktivnost

Fizična aktivnost je lahko povezana z DT preko več mehanizmov, ki so prikazani na Sliki 4 (83). Kljub naštetim mehanizmom in dejstvu, da fizična aktivnost zmanjša tveganje za veliko kroničnih stanj, največji povzetek do sedaj podaja v glavnem nesignifikantne rezultate in 3 možne tipe asociacij: pozitivno, ni asociacije in U asociacijo (63). U asociacija je sicer najredkejša, a specifična za ta primer in pomeni, da je srednja fizična aktivnost bolj povezana z daljšimi telomerami, kot znižana ali povišana aktivnost. Nasprotujoči rezultati so lahko posledica različnih metod merjenja fizične aktivnosti (samoocenjevalni vprašalniki, objektivno merjenje z merilci minut gibanja), merjenja DT v različnih bioloških vzorcih (levkocitih, polni krvi, mišičnih celicah), načina merjenja DT (qPCR, TRF), različne velikosti preiskovanih skupin, karakteristik preiskovancev (atleti, maratonce, neaktivni) in različnih starostnih skupin (63, 84). Kljub temu, da je s perspektive javnega zdravja razumevanje

povezanosti fizične aktivnosti in DTL vedno bolj pomembno pri starejših ljudeh, ki so najmanj fizično aktiven del populacije in imajo visoko prevalenco kroničnih boleznih in skrajšane telomere, ni veliko dosedanjih študij narejenih na populaciji starejših (84). Samo 3 študije iz literaturnega povzetka, narejenega 2017, obsegajo populacijo starejših (85–87), od katerih 2 podajata signifikantnost. V istem viru je le ena študija narejena na pomenopavznih ženskah, kjer so dokazali povezanost daljših telomer pri osebah, ki so se gibale glede na tiste, ki se niso (50). Dokončnega odgovora na vprašanje o povezanosti DT s fizično aktivnostjo tako še nimamo in so potrebne nadaljnje longitudinalne študije predvsem na starejši populaciji, ki bi ji s pozitivnimi izsledki takšnih študij pomagali do bolj zdravega staranja.



Slika 4: Mehanizmi možne povezave fizične aktivnosti z dolžino telomer [prirejeno po (83)].

2 NAMEN

Namen magistrske naloge bo preučiti povezanost dolžine telomer v levkocitih s staranjem in nekaterimi dejavniki načina življenja v vzorcu slovenskih pomenopavznih žensk.

Naša hipoteza je, da je dolžina telomer v levkocitih povezana s kronološko starostjo, starostjo ob menopavzi, leti mene, indeksom telesne mase, obsegom pasu, kajenjem, fizično aktivnostjo/neaktivnostjo, urami telesne aktivnosti na teden in z urami hoje/teka/kolesarjenja/plavanja/drugo na teden v vzorcu slovenskih pomenopavznih žensk.

Za dosego namena bomo:

- izolirali DNA iz izbranih vzorcev polne krvi preiskovank, preverili njeno koncentracijo, čistost in dolžino;
- s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času pridobili podatek o dolžini telomer v levkocitih;
- s statistično analizo ugotovili povezanost med pridobljenim podatkom o dolžini telomer v levkocitih in zbranimi podatki, ki opisujejo staranje in način življenja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANK IN PRIDOBITEV PODATKOV

Potrebne podatke o preiskovankah in vzorce njihove polne krvi, ki smo jih uporabili v magistrski nalogi, smo pridobili s sodelovanjem s Kliničnim oddelkom za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Preiskovanke so prostovoljno podpisale pristopno izjavo, v kateri je navedeno, da njihove podatke lahko uporabljamo le v raziskovalne namene. Izbrali smo 275 preiskovank po naslednjih kriterijih. Vse so morale biti mlajše od 90 let in v pomenopavznem obdobju. Poleg tega niso smele v preteklosti prejemati nobenega zdravila za osteoporozo (izjema jemanje kalcija in vitamina D) in niso imele znanih bolezni ledvic, jeter ali endokrinih bolezni. Vsem preiskovankam smo vzeli vzorce polne krvi med 8:00 in 10:00 zjutraj za analizo dolžine telomer v levkocitih. Vse ostale podatke o preiskovankah, ki smo jih potrebovali za našo nalogo, smo pridobili s pomočjo vprašalnika (starost, starost ob menopavzi, status kajenja, fizična aktivnost) ali pa so bili del splošnega pregleda pri zdravniku (višina, teža, obseg pasu). Raziskava je bila odobrena s strani Etične komisije RS, številka odobritve 108/12/05.

3.2 MATERIALI, REAGENTI IN APARATURE

Materiali in reagenti, potrebni pri izolaciji DNA s kompletom FlexiGene[®] DNA Kit

- FlexiGene[®] DNA Kit (QIAGEN[®]) s pufrom FG1 (lizni pufer), FG2 (denuracijski pufer), FG3 (hidratijski pufer sestavljen iz 10 mM Tris-Cl, pH 8,5) in liofilizirano QIAGEN proteinazo
- 100 % izopropanol (Merck)
- 70 % etanol (Emsure)
- 3 % natrijev hipoklorit (Kemika)

Materiali in reagenti za izvedbo elektroforeze

- Agaroz v prahu (Sigma-Aldrich)
- 1 x TAE pufer (Tris-EDTA): pripravljen iz 20 mL 50 x TAE pufera in dopolnjen z ultra čisto vodo do 1000 mL. 50 x TAE pufer: pripravljen iz 242,0 g Tris-baze, 57,1 g očetne kisline, 100 mL 0,5 mol EDTA in dopolnjen do 1000 mL z ultra čisto vodo. pH

umerjen na 8.

- Destilirana voda
- Barvilo Miodori Green (Nippon Genetics)
- Nanašalni pufer bromfenol modro (Fluka)
- Marker Quick-Load 1 kb DNA Ladder, ki vsebuje fragmente velikosti 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb in 0,5 kb (Promega)

Materiali in reagenti za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)

- Delovne raztopine DNA s koncentracijo 10 ng/μL, standardi in kalibrator
- Ultra čista voda (Sigma)
- 5 HOT FIREPol EvaGreen qPCR SuperMix (Solis BioDyne)
- F-oligonukleotidni začetnik TelgF in AlbuF (400nM) (Sigma)
- R-oligonukleotidni začetnik TelcR in AlbuR (400nM) (Sigma)

Aparature in pribor

- Avtoklav (Laboklav 25)
- Škatle za pipetne nastavke za avtoklaviranje in stekleni kozarci za plastične epruvetke
- Avtoklavirani pipetni nastavki: 10, 200, 1000 μL in 5 mL (Eppendorf, Sarstedt)
- Avtoklavirane plastične epruvetke: 0,5 in 1,5 mL (Sarstedt)
- Sterilne centrifugirke: 15 in 50 mL (Sarstedt)
- Sušilnik (Heraeus)
- Vodna kopel (Biosan Water Bath-termostat WB 4MS)
- Ledena kopel
- Centrifuga (Eppendorf-Centrifuge 5804 R)
- Vrtinčasto mešalo-Vortex (Biosan BioVortex VI)
- Polavtomatske pipete: 0,1-2,5 μL, 2-20 μL, 100-1000 μL (Eppendorf) in 500-5000 μL (Biohit)
- Sterilne vatirane palčke (Deltalab)
- Parafilm (Bemis)
- NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000
- Papir za čiščenje NanoDrop glave
- Tehnica (Vibra)

- Digestorij (Waldner electronics)
- Kadička za gel, nosilec za gel, glavnički 20, elektroforezna kadička (Biorad)
- Erlenmajerica, žlička za tehtanje, merilni valj, urno steklo, krovna stekelca
- Mikrovalovna pečica (Optiquick compact)
- UVITEC CAMBRIDGE
- LightCycler® 480 II (Roche)
- Komora DNA/RNA UV-CLEAT UVT-S-AR (Biosan)
- Mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinami Framestar® in folije za mikrotitrne ploščice (4titute)
- Ploščica za pritrditev folije na mikrotitrne ploščice
- Centrifuga Centric 322A (Tehnica) in centrifuga FVL-2400N Combi-Spin (Biosan)

3.3 IZOLACIJA DNA S KOMPLETOM FlexiGene® DNA Kit

Z izolacijo smo osamili čiste nukleinske kisline in tako pridobili genomsko DNA, ki smo jo potrebovali za nadaljnje analize. Genomsko DNA smo izolirali iz vzorcev polne krvi preiskovank, ki so bili prehodno odvzeti v ustrezno označene epruvete z dodatkom EDTA in do izolacije primerno shranjeni-zamrznjeni. Za izolacijo smo uporabili komercialno pripravljen komplet FlexiGene® DNA Kit. Komplet vsebuje tri pufre FG1, FG2, FG3 in liofilizirano QIAGEN proteinazo. DNA smo izolirali po postopku, opisanem v brošuri priloženi FlexiGene® DNA Kitu (88) z nekaj modifikacijami, ki so se med rutinskim laboratorijskim delom izkazale za primernejše. Vzorcem smo dodali lizni pufer FG1, da smo povzročili lizo membran krvnih celic in posledično omogočili, da so se prosta celična jedra in mitohondriji po centrifugiranju zbrala v peletko. Peletko smo resuspendirali in inkubirali v denaturacijskem pufru FG2 z raztopljeno QIAGEN proteinazo. S kaotropnimi solmi in proteinazo vsebujočim denaturacijskim pufrom smo odstranili kontaminante kot so proteini. Sledila je oboritev DNA z dodatkom izopropanola, njeno čiščenje oziroma spiranje z 70 % etanolom, sušenje in raztapljanje v hidratacijskem pufru FG3. Ta postopek izolacije DNA je hiter in enostaven in omogoča izolacijo iz 0,1-10 mL polne človeške krvi, plasti levkocitov in kultiviranih celic ter daje visoke izkoristke.

Priprava na izolacijo

- Priprava raztopine proteinaze: k liofilizirani QIAGEN proteinazi smo dodali 1,4 mL

pufra FG3 in vse skupaj dobro premešali. Tako pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku in jo vzeli ven le za kratek čas za pripravo mešanice pufra FG2 in raztopine proteinaze, medtem pa smo jo hranili na ledu.

- Prižgali smo centrifugo in jo nastavili na 4 °C in 2500 x g za 9 min.
- Delovno površino, pipete in vse ostale pripomočke smo prebrislali s 70 % etanolom.
- Iz zamrzovalnika smo vzeli epruvete z vzorci in jih shranili na ledu.
- Iz nalepk na epruveh smo prepisali podatke o preiskovankah v laboratorijski dnevnik in na vrat ter pokrovček 15 mL centrifugirke.
- Zamrznjene epruvete s krvjo smo postavili v vodno kopel na 37 °C za 10 min, da smo kri odtalili. Po 10 min smo jih postavili na led do analize.
- Izračun potrebnih volumnov za pripravo mešanice pufra FG2 in raztopine proteinaze: za vsak mL krvi smo zmešali 500 µL pufra FG2 in 5 µL raztopljenih proteinaz. Mešanico smo lahko pripravili največ 1 uro pred izolacijo.
- Po odtalitvi vzorcev smo temperaturo vodne kopeli dvignili na 65 °C.

Postopek

1. V prazno centrifugirko smo odpipetirali 7,5 mL pufra FG1 in dodali 3 mL prej z obračanjem premešane odtaljene krvi. Zaprto centrifugirko smo na roke močno stresali (20x).
2. Pripravljeno mešanico smo centrifugirali 9 min na 2500 x g pri 4 °C.
3. Med centrifugiranjem smo pripravili mešanico pufra FG2 in raztopljenih proteinaz.
4. Po centrifugiranju smo pazljivo odlili supernatant in pustili obrnjene centrifugirke navzdol na čisto papirnato brisačo za 2 min, da smo odstranili še ostanek. Med odlivanjem smo zelo pazili na pelet, da je ostala prilepljena na centrifugirko.
5. Centrifugirkam s peletami smo dodali 1,5 mL mešanice pufra FG2 in raztopljenih proteinaz in po vsakem dodatku takoj premešali vsebino centrifugirke na vrtnčastem mešalu pri najvišji hitrosti, da se je peleta povsem homogenizirala. (3–4 x 5 s) Če se ni, smo dodali še 300 µL pufra FG2 in ponovno dobro premešali.
6. Centrifugirke smo obrnili 3x in jih inkubirali v vodni kopeli na 65 °C vsaj 10 min. Pri tem se je barva vzorcev spremenila iz rdeče v zeleno zaradi denaturacije hemoglobina. Če ta sprememba ni bila popolna, smo čas inkubacije podaljšali največ do 30 min.
7. Po inkubaciji smo dodali 1,5 mL 100 % izopropanola in centrifugirke počasi obračali

- v roki, dokler se DNA ni povsem izoborila in postala vidna (20x).
8. Centrifugirke z oborjeno DNA smo centrifugirali 6 min na 2500 x g pri 4 °C.
 9. Ponovno smo previdno odstranili supernatant v odpadno posodo in pustili centrifugirko obrnjeno navzdol na čisti papirnati brisači nekaj minut.
 10. Dodali smo 1,5 mL 70 % etanola in premešali na najnižji hitrosti 5 s ali malo dlje, dokler se izolirana DNA ni odlepila od stene centrifugirke.
 11. Po odlepljenju pelete smo vzorec centrifugirali 6 min na 2500 x g pri 4 °C.
 12. Previdno smo odlili supernatant in pustili obrnjeno centrifugirko na čistem papirju najmanj 5 min.
 13. Peletko smo sušili na zraku vsaj 5 min, da je odparel ves etanol. Če stene centrifugirke še niso bile suhe, smo sušenje podaljšali na 1 uro ali s sterilno vatirano palčko prebrisali notranjost in pri tem pazili, da se nismo dotaknili pelete.
 14. Po odstranitvi etanola smo dodali k peleti 600 µL pufru FG3 in premešali na nizki hitrosti. Če je bila peleta z DNA zelo majhna, smo dodali le 300 µL pufru.
 15. DNA smo inkubirali čez noč na 65 °C, da se je popolnoma raztopila v pufru FG3. Inkubator smo zavili v parafilm, da je bilo čim manj izhlapevanja in spreminjanja temperature.
 16. Naslednji dan smo raztopljeno DNA prepipetirali v avtoklavirane in prej primerno označene 1,5 mL epruvetke in jih shranili v hladilniku do naslednje analize.

3.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLIRANE DNA

Po izolaciji DNA smo vsakemu vzorcu izmerili njegovo koncentracijo in čistost. S tem smo preverili kvaliteto svojega dela med izolacijo in predvideli morebitne nadaljnje probleme pri qPCR, povezane s kvaliteto DNA. Te kvantitativne in kvalitativne lastnosti DNA smo določali s spektrofotometrom NanoDrop® 1000. Preko spektrofotometričnega merjenja absorbance pri 260 nm smo določili koncentracijo izoliranih vzorcev DNA, ki smo jo v nadaljevanju potrebovali tudi za pripravo redčenih vzorcev za reakcije qPCR. Čistost smo preverjali preko meritev absorbance pri valovnih dolžinah 260, 280 in 230 nm. Z razmerjem A260/A280 smo ocenili kontaminacijo s proteini. Ker smo želeli čim bolj čisto raztopino DNA brez proteinov, smo težili k razmerju okoli 1,8, s sprejemljivimi vrednostmi med 1,7 in 2,0. Nižje vrednosti nakazujejo na kontaminacijo s proteini, saj triptofan in tirozin v proteinih močno absorbirata pri 280 nm. Z razmerjem A260/A230 smo ocenili kontaminacijo z reagenti, uporabljenimi

med izolacijo in smo želeli vrednost okoli 2,0 s spremenljivimi vrednostmi med 2,0 in 2,2. Odstopanja od teh vrednosti kažejo na kontaminacijo (89).

Postopek

Pred meritvami smo vsak vzorec najprej premešali z vrtinčastim mešalom na najnižji hitrosti in nato zavrteli v centrifugi, da se je tekočina zbrala na dnu. Nato smo na NanoDrop® 1000 ekranu izbrali ikono z oznako dvojne vijačnice (dsDNA), ki predstavlja program za merjenje dvojno vijačne DNA. Na glavo merilne naprave smo odpipetirali 1,5 µL demineralizirane vode, jo obrisali in jo na ta način očistili. Po očiščenju smo odpipetirali 1,5 µL pufru FG3, jo zaprli in izmerili vrednost slepega vzorca. Za slepi vzorec smo izbrali pufer, v katerem smo v zadnji stopnji izolacije raztopili naše vzorce. Če je bila meritev slepega vzorca ustrezna, smo obrisali glavo, nanjo odpipetirali 1,5 µL prvega vzorca, napisali v napravo številko vzorca in glavo zaprli. Tako izmerjeno koncentracijo in razmerja smo prepisali in ta korak ponovili za vsak posamezni vzorec. Po končanem merjenju smo ponovno očistili merilno glavo kot v prvem koraku.

3.5 OCENA VELIKOSTI IZOLIRANE DNA Z AGAROZNO GELSKO ELEKTROFOREZO

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju in se uporablja za medsebojno ločevanje makromolekul v telesnih tekočinah in tkivih. Delci se ločijo glede na naboj, saj pozitivno nabiti delci potujejo v smeri negativno nabite elektrode katode, medtem ko negativno nabiti delci potujejo v smeri pozitivno nabite elektrode anode, in glede na velikost ter obliko. Ker so molekule DNA bogate s fosfatnimi skupinami, ki imajo pri nevtralnem ali alkalnem pH negativen naboj, v električnem polju potujejo proti anodi. Za DNA je značilno tudi enako razmerje masa/naboj, ki omogoča ločbo DNA le po dolžini fragmentov. Tako smo elektroforezo lahko uporabili tudi za oceno velikosti naše izolirane DNA. Uporabili smo agarozno gelsko elektroforezo, ki ločuje fragmente DNA dolge od 100 bp do 25 kb, in pri kateri je hitrost potovanja fragmentov odvisna od velikosti in konformacije DNA, koncentracije in tipa agaroze, napetosti ter sestave elektroforeznega pufru (90).

Priprava 2 % agaroznega gela

1. V digestoriju smo pripravili nosilec za gel, tako da smo najprej z etanolom prebrisali

- kadičko, nastavek in glavničke za 20 žepkov ter jih nato sestavili. Kadičko smo z merilcem poravnali vodoravno v nastavek in s tem dosegli enakomerno debelino gela.
2. V 100 mL erlenmajerico smo zatehtali 1,5 g agaroze in dodali 75 mL pufra 1x TAE.
 3. Erlenmajerico smo pokrili z urnim stekelcem, jo položili na tehtnico in starirali. Nato smo vse skupaj segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se vsebina ni povsem raztopila.
 4. Erlenmajerico smo postavili ponovno na starirano tehtnico in dodali izparjeni del z destilirano vodo.
 5. Pustili smo, da se je v digestoriju raztopina nekoliko ohladila in nato dodali 1,5 μ L barvila Miodori Green, premešali ter gel počasi ulili v pripravljen model. Morebitne mehurčke smo odstranili s pipetnim nastavkom. Počakali smo 1 uro, da se je gel strdil. Med strjevanjem smo ga pokrili s kartonasto škatlo in s tem preprečili okoliško kontaminacijo ter dostop svetlobe.
 6. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavničke in ga ali takoj uporabili ali ga previdno vzeli ven iz nosilca in ga shranili v označeni plastični vrečki v hladilniku do uporabe. Tako shranjen gel smo morali porabiti v 1 mesecu.

Postopek elektroforeze

1. Vzorce smo na kratko premešali z vrtinčastim mešalom pri najnižji hitrosti in kratko centrifugirali, da se je tekočina epruvetk zbrala na dnu.
2. Prej pripravljen gel smo postavili v elektroforezno kadičko, ga prelili z 1x TAE pufrom do oznake na kadički in ga obložili z dvema krovnama stekelcema.
Na parafilm smo napipetirali večkrat po 2 μ L nanašalnega pufra bromfenol modro. Dvema kapljicama nanašalnega pufra smo primešali 3,5 μ L označevalca Quick-Load 1kb DNA Ladder in vse skupaj prenesli v prve žepke gela. Ostalim kaplicam nanašalnega pufra smo primešali po 3 μ L naših vzorcev in tudi to prenesli v ostale žepke gela.
3. Ko smo prenesli vse željene vzorce, smo kadičko pokrili, preverili pravilnost postavitve elektrod (zgoraj levo črna katoda in spodaj desno rdeča anoda), nastavili program, preverili delovanje (ob elektrodah so morali izhajati mehurčki) in pustili elektroforezo teči 30 min pri napetosti 100 V in toku 400 mA.

Detekcijo lis smo opravili z aparatom UVITEC CAMBRIDGE. Najprej smo prižgali aparat in računalnik ter v komoro naprave položili s spodnje strani osušen gel. Zagnali smo program

UVITEC, izbrali UV fluorescenco, nastavili na svetilnost 8 in pritisnili Start. UVITECH CAMBRIDGE deluje na osnovi vzbuditve fluoroforov, v našem primeru Midori Green, z UV svetlobo. Te molekule absorbirajo eksitacijsko energijo in s tem dosežejo višjo energijsko stanje. Ko se vračajo nazaj v osnovno stanje, emitirajo fluorescenčno svetlobo, ki jo UVITEC zazna in nam tako omogoči določiti pozicijo lis vzorcev in količino le-teh.

3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR je *in vitro* metoda, ki omogoča sintezo nukleinskih kislin in pomnožitev velikega števila kopij želenega odseka DNA iz majhne količine vzorca v relativno kratkem času. Za izvedbo potrebujemo vzorce DNA, ki služijo kot matrica, oligonukleotidna začetnika, ki omejita odsek pomnoževanja, deoksinukleozid-trifosfate kot gradnike za nove verige DNA, termostabilno DNA-polimerazo, Mg^{2+} ione (kofaktorje DNA-polimeraze) in reakcijski pufer (z uravnavanjem pH zagotovimo optimalne pogoje za delovanje encima). Je ciklična reakcija, sestavljena iz treh stopenj:

- Denaturacija: s segrevanjem na 94–95 °C razpremo verigi DNA.
- Prileganje nukleotidnih začetnikov: temperaturo zmanjšamo na 40–50 °C, pri čemer pride do vezave začetnikov na enoverižno DNA.
- Podaljševanje: temperaturo ponovno dvignemo, tokrat na 72 °C in omogočimo optimalno okolje, pri katerem termostabilna DNA-polimeraza izgradi koplementarno verigo DNA v smeri 5` proti 3`.

S časom so razvili veliko različic PCR, ki vse temeljijo na enakem zgoraj opisanem principu. Ena izmed različic je tudi verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR), ki smo jo uporabili v okviru naše raziskave in predstavlja nadgradnjo prej opisane konvencionalne PCR. Glavno nadgradnjo predstavlja možnost sočasnega poteka pomnoževanja in detekcije pomnožene DNA. S tem se poveča zanesljivost rezultatov, skrajša čas reakcije in zmanjša možnost kontaminacije. Zaradi kontinuiranega beleženja količine nastale DNA v vsakem ciklu posebej, lahko izmerimo količino PCR produkta še v času njegove eksponentne rasti. To je pomembno, ker samo v eksponentni fazi lahko zanesljivo sklepamo o začetnem številu kopij matrice v vzorcu. Količino nastale DNA v fazi eksponentne rasti spremljamo z določevanjem kvantifikacijskega cikla (C_q). C_q je tisti cikel, določen v eksponentni fazi, pri katerem je intenziteta fluorescence za vzorec značilno višja od fluorescence ozadja. C_q in začetno število kopij sta v obratnem sorazmerju. Z C_q primerjamo vzorce med seboj. Za

kontinuirano spremljanje PCR produktov smo uporabili fluorescenčno barvilo Eva Green, ki ob ekscitaciji močno fluorescira, kadar je nespecifično reverzibilno vrinjeno v nastajajočo dvoverižno DNA. Pri tem je količina oddane fluorescenčne svetlobe sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNA. Takšen način detekcije je nespecifičen, saj se barvilo veže v vsako dvoverižno DNA, torej moramo reakcijo dobro optimizirati, da ne nastajajo nespecifični produkti (90).

Redčenje vzorcev

Vzorci izolirane DNA z različnimi koncentracijami smo redčili v dveh stopnjah. Najprej smo dobro premešali vzorce in vsak posamezni vzorec redčili tako, da smo dobili koncentracijo vzorca $C_2=50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in skupen volumen $V_2=40 \mu\text{L}$, počakali čez noč in mu ponovno izmerili koncentracijo. Na podlagi te koncentracije smo vzorec nadalje redčili na končno željeno koncentracijo $C_2=10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in skupen volumen $V_2=100 \mu\text{L}$. Tako pripravljene vzorce smo pustili čakati vsaj čez noč, preden smo jih uporabili za qPCR.

Priprava standardov za umeritveno krivuljo

Osnovni vzorec s koncentracijo $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in volumnom $300 \mu\text{L}$ smo pripravili iz 10 vzorcev izolirane DNA (2560, 2882, 2499, 2805, 2849, 2860, 2543, 2548, 2777, 2842), ki so bili visoke čistosti. Tako pripravljen osnovni vzorec smo dobro premešali in shranili v hladilnik preko noči. Osnovni vzorec smo izdelali, ker smo želeli, da ne bi prišlo do večje porabe le enega vzorca. Naslednji dan smo iz njega s serijsko redčitvijo pripravili 6 standardov koncentracije 80, 40, 20, 10, 5, $2,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Standarde smo hranili v zamrzovalniku do qPCR.

Priprava kalibratorja

Za kalibrator smo izbrali izolirano DNA vzorca 2569. Izbrali smo ga na podlagi visoke čistosti in velikega volumna. Redčili smo ga v dveh stopnjah enako kot vzorce do končne koncentracije $C_2=10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in volumna $V_2=150 \mu\text{L}$. Tako pripravljen kalibrator smo dobro premešali in shranili v zamrzovalniku do analize qPCR.

Postopek qPCR

1. Z etanolom smo prebrisali komoro in centrifugo. Druge potrebne stvari smo prebrisali s hipokloritom. Nato smo za 30 min prižgali UV luč.
2. Medtem smo iz zamrzovalnika vzeli vse reagente (oligonukleotidne začetnike,

EvaGreen, ultra čisto vodo, standarde in kalibrator) in jih prestavili v hladilnik, da so se odtalili. V program smo vnesli načrt pipetiranja.

3. Pripravili smo reakcijsko zmes, ki je prikazana v Preglednici 4, le da smo volumne posameznih reagentov preračunali glede na željeno število uporabljenih luknjic mikrotitrne ploščice (za vsak vzorec 3 ponovitve oziroma luknjice). V 1,5 mL plastično epruvetko smo po vrsti najprej odpipetirali ultra čisto vodo, nato raztopino oligonukleotidnih začetnikov in na koncu EvaGreen Master mix.
4. Vzeli smo mikrotitrsko ploščico s 384 luknjami in v izbrane luknjice odpipetirali po 8 μ L reakcijske zmesi in nato vsaki luknjici dodali po 2 μ L željenega vzorca, standarda ali v slepi vzorec po 2 μ L ultra čiste vode. Slep vzorec je služil kot dokaz, da med pripravo reakcijske zmesi ni prišlo do kontaminacije reagentov.
5. Na ploščico smo pritrdili prozorno folijo, jo centrifugirali 2 min na 1900 x g, da smo se znebili morebitnih mehurčkov, ploščico položili v LightCycler ter izbrali program glede na uporabljene oligonukleotidne začetnike (Preglednica 3).

Preglednica 3: Temperaturni profil pomnoževanja: levo za telomere, desno za albumin.

TEMPERATURA [°C]	ČAS	ŠTEVLO CIKLOV	TEMPERATURA [°C]	ČAS	ŠTEVLO CIKLOV
95	12 min	1	95	12 min	1
95	15 s	4	95	15 s	40
49	20 s		62	10 s	
95	15 s	40	87	15 s	
62	10 s				
72	15 s				

Priprava reakcijske zmesi

Reakcijsko zmes brez dodanega vzorca ali standarda smo vedno pripravili sproti v komori in v volumnih reagentov, ki smo jih potrebovali. Vzorec smo dodali naknadno. Reakcijska zmes za eno luknjico je podana v Preglednici 4. Mešanici sta bili tako za reakcije s telomerami kot z albuminom enaki. Razlikovali sta se le v dodanih oligonukleotidnih začetnikih. Reakciji qPCR za vsak gen posebej sta potekali ločeno na različnih mikrotitrskih ploščicah, a vedno v istem ali naslednjem dnevu.

Preglednica 4: Reakcijska zmes za izvedbo qPCR: volumni posameznih reagentov podani na eno luknjico mikrotitrne ploščice.

REAGENT	KONCENTRACIJA	VOLUMEN [μ L]
Ultra čista voda (dH ₂ O)	/	2
Eva Green Master Mix (5x)	1X	2
F-oligonukleotidni začetnik	400nM	2
R-oligonukleotidni začetnik	400nM	2
Vzorec/standard/dH ₂ O	10 ng/ μ L	2
SKUPNO:		10

Oligonukleotidni začetniki

Spodnja 4 zaporedja oligonukleotidov smo dobili v viali v liofilizirani obliki. Ko smo prvič izvajali analizo, smo liofilizirane oligonukleotide redčili z d(H₂O) najprej v koncentrat I s koncentracijo 100 μ M. Koncentrat I smo naprej redčili v koncentrat II s koncentracijo 2 μ M. Koncentrate I smo shranjevali globoko zamrznjene, medtem ko smo koncentrate II pripravljali za nekaj reakcij v naprej v obliki alikvotov in jih shranjevali v zamrzovalniku.

Oligonukleotidni začetniki za telomere (tarčni gen):

F-oligonukleotidni začetnik

5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3'

R-oligonukleotidni začetnik

5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATC CCTATCCCTAACA-3'

Oligonukleotidni začetniki za albumin (referenčni gen):

F-oligonukleotidni začetnik

5'-CGGCGGCGGGCGGGCGGGCTGGGCGGAAATGCTGCACAGAATCCTTG-3'

R-oligonukleotidni začetnik

5'-GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGAAAAGCATGGTCGCCTGTT-3'

Relativna kvantifikacija z metodo standardne krivulje

Po končanem qPCR smo dobljene rezultate relativno kvantificirali, kar pomeni, da smo izračunali razmerje med preiskovanim vzorcem (tarčni genom) in kalibratorjem. Vrednost vzorca in kalibratorja pa smo pred izračunom razmerja normalizirali glede na endogeni referenčni gen, s čimer smo izničili morebitna odstopanja v koncentraciji vzorcev in razlike v nanašalnem volumnu med vzorci. V izračunu smo uporabili koncentracije posameznih genov

ali kalibratorjev, ki smo jih dobili preko metode standardne krivulje, za katero smo se odločili, ker se izbrana gena nista enako učinkovito pomnoževala. Standardno krivuljo smo naredili v vsaki seriji analize vzorcev za oba gena iz standardov različnih koncentracij. Za telomere in referenčni gen smo preko podatka Cq in umeritvene krivulje pridobili koncentracijo za vsak vzorec. Ker so analize potekale v več sklopih, smo pri vsaki uporabili tudi kalibrator, preko katerega smo lahko izničili vpliv napake delovanja naprave in primerjali mikrotitrne ploščice med seboj. Iz umeritvenih krivulj smo preko Cq kalibratorja pridobili tudi koncentracijo kalibratorja. Dolžino telomer smo nato izračunali po Enačbi 1. Eksperiment smo izvedli v triplikatih, zato smo v enačbi uporabili povprečja podatkov. Standardna deviacija (SD) Cq med triplikati je morala biti pod 0,3. Če je bila SD nad to mejo, smo izločili Cq, ki je od vseh meritev najbolj odstopal.

Enačba 1: Enačba, po kateri smo izračunali relativno dolžino telomer.

$$\text{relativna dolžina telomer} = \frac{\frac{c(\text{tarčni gen})}{c(\text{kalibrator tarčni gen})}}{\frac{c(\text{referenčni gen})}{c(\text{kalibrator referenčni gen})}}$$

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški programski paket IBM SPSS statistics 22. Pri vseh analizah smo kot statistično značilno razliko upoštevali vrednost $p < 0,05$. Kot mejno statistično razliko pa p -vrednost med 0,05 in 0,10.

Naša analiza je potekala po naslednjih korakih:

1. Naše statistično raziskovanje smo razdelili na 5 področij: staranje, reproduktivno staranje, debelost, kajenje in fizično aktivnost. Za vsako od področij smo za ugotavljanje povezanosti z DTL uporabili naslednje podatke: staranje (kronološka starost), reproduktivno staranje (starost ob menopavzi, leta mene), debelost (ITM, obseg pasu), kajenje (zdaj nekadilci/zdaj kadilci/kadarkoli kadilci/nekdanji kadilci /nikoli kadilci) in fizično aktivnost (ure telesne aktivnosti/teden ne glede na tip aktivnosti, fizično aktivni/neaktivni, ure hoje/teka/kolesarjenja/plavanja/drugo/teden).
2. Za izbrane podatke smo preverili normalnost porazdelitve s Shapiro-Willk testom. V primeru normalne porazdelitve podatkov smo v nadaljevanju uporabili parametrične teste, v primeru nenormalne porazdelitve pa neparametrične.
3. Za oceno povezanosti podatkov o preiskovancih z DTL smo uporabili Spearmanov

dvostranski neparametrični test (za nenormalno porazdeljene kontinuirane ali kategorične parametre) in Pearsonov dvostranski parametrični test (za normalno porazdeljene kontinuirane parametre). Oba testa nam podata koeficient korelacije z vrednostjo od -1 do 1. Vrednosti -1 ali 1 nam povesta, da je prisotna perfektna negativna oziroma pozitivna linearna korelacija. Vrednost 0 pa pove, da ni linearne korelacije. Njihov odnos smo pogledali tudi z linearno regresijo.

4. Z neodvisnim t-testom smo ugotavljali razliko med srednjimi vrednostmi podatkov, ki so bili razvrščeni v dve skupini. Ko so bili podatki razvrščeni v več neodvisnih skupin, smo uporabili preizkus domneve o enakosti več aritmetičnih sredin ali analizo variance (ANOVA). Vpliv kovariate (v našem primeru le starost) na odnos dveh spremenljivk smo ugotavljali z analizo kovariance (ANCOVA).
5. S testom hi-kvadrat smo pregledali tudi frekvenčno porazdelitev med skupinami.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PREVERJANJE KONCENTRACIJE, ČISTOSTI IN VELIKOSTI IZOLIRANE DNA

S FlexiGene® DNA Kitom smo izolirali DNA iz skupno 292 vzorcev polne krvi preiskovank. Vzorci polne krvi so bili odvzeti v letih 2013 do 2017 in izolirani v letih 2017 do 2018. DNA smo izolirali po modificiranem postopku proizvajalca, ki je rutinsko uporabljen postopek za izolacijo iz polne krvi na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za Farmacijo. Izolacija je večinoma potekala brez problemov. Nekaj težav smo imeli pri izolaciji DNA iz starejše krvi. Pri starejši krvi se je v epruveti s polno krvjo pojavila usedlina, ki je nismo mogli razbiti oziroma v celoti prenesti v drugo plastično centrifugirko, in drseča peletka po prvem centrifugiranju. Pri ostalih vzorcih se je občasno pojavila nepopolna zelena barva po 30 min inkubaciji s proteinazo (niso se odstranili vsi proteini). V zadnjem delu izolacije sta bili težavi predvsem počasno izhlapevanje etanola, ki je potekalo veliko dlje, kot je napisano v postopku, in neraztopljena DNA, ki se ni raztopila tudi po nočni inkubaciji.

4.1.1 Ocena koncentracije in čistosti izolirane DNA

Od 292 vzorcev izolirane DNA smo 275 vzorcem (6 vzorcev smo izolirali dvakrat, za 11 izoliranih vzorcev pa nismo imeli ostalih potrebnih podatkov o preiskovankah) pomerili koncentracije in čistosti DNA s spektrofotometrom NanoDrop® 1000 in tako ocenili uspešnost izolacije DNA. Koncentracije in čistosti vseh vzorcev so prikazane v preglednici v Prilogi A. Povprečna koncentracija DNA izoliranih vzorcev je bila 180,52 ng/μL (SD=88,26). Kar velike razlike v koncentraciji DNA med vzorci so posledica predvsem različnega števila levkocitov v odvzetem vzorcu polne krvi med različnimi vzorci, kar se je lahko videlo tudi v velikosti peletke med izolacijo. Drugih razlogov za nihanja ni, saj se nam je DNA med izolacijo pri vseh vzorcih izoborila in peletka večinoma dobro raztapljala. Čistost smo ocenili preko razmerij absorbanc. Povprečje razmerja absorbanc pri valovni dolžini 260 nm in 280 nm je bilo 1,84 (SD=0,04), pri valovni dolžini 260 nm in 230 nm pa 1,61 (SD=0,27). Povprečno razmerje A260/A280 izoliranih vzorcev je med vrednostmi 1,7 in 2,0, ki so mejne vrednosti za določevanje kontaminacije s proteini. Ker je vrednost okoli 1,8 lahko rečemo, da večina naših vzorcev ni kontaminiranih s proteini. Povprečno razmerje A260/A230 izoliranih vzorcev pa je dosti nižje od sprejemljivih vrednosti med 2,0 in 2,2 in kaže na možnost

kontaminacije izoliranih vzorcev s topili ali reagenti uporabljenimi med izolacijo (v našem primeru npr. etanol, EDTA, soli). Razlog za to je verjetno težko odstranjevanje etanola na koncu izolacije pred končnim raztapljanjem DNA in nepopolno odstranjevanje supernatanta zaradi drseče peletke. Prisotnost teh topil bi lahko v nadaljevanju vplivala na učinkovitost qPCR, saj so te snovi inaktivatorji DNA-polimeraze. A ker za PCR uporabimo zelo majhne količine izolirane DNA, je verjetno vsebnost teh snovi v naših razredčenih vzorcih premajhna, da bi drastično vplivala na učinkovitost qPCR, kar se je potrdilo v nadaljnjih eksperimentih.

4.1.1 Ocena velikosti izolirane DNA

Preverili smo tudi velikost izolirane DNA z agarozno gelsko elektroforezo, ki je pokazala, da so vsi vzorci daljši od 50 kb. Zelo malo vzorcev je bilo tudi rahlo fragmentiranih, vendar smo jih v nadaljevanju vseeno uporabili, saj lahko take vzorce brez težav uporabimo, če v nadaljevanju pomnožujemo krajše odseke.

Na podlagi ocene koncentracije in dolžine DNA ter prisotnosti proteinov in topil lahko rečemo, da je izolirana DNA primerne koncentracije, čistosti in dolžine za nadaljnjo analizo qPCR.

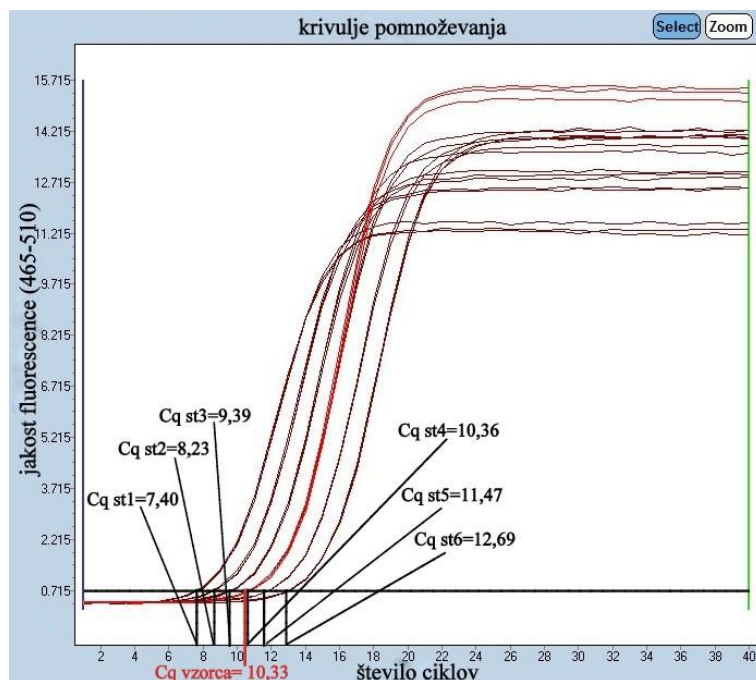
4.2 DOLOČANJE RELATIVNE DOLŽINE TELOMER V LEVKOCITIH Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)

Za merjenje relativne dolžine telomer v levkocitih smo uporabili qPCR, ki je najbolj razširjena metoda za merjenje DT. Kljub temu, da ni zlati standard, se pogosteje uporablja predvsem zaradi večje enostavnosti, manjše porabe vzorcev, večje časovne učinkovitosti in cenovne ugodnosti. Zlati standard TRF in qPCR se razlikujeta tudi v končnem rezultatu. Pri TRF kot rezultat dobimo absolutno DT, medtem ko pri qPCR relativno DT (26, 27).

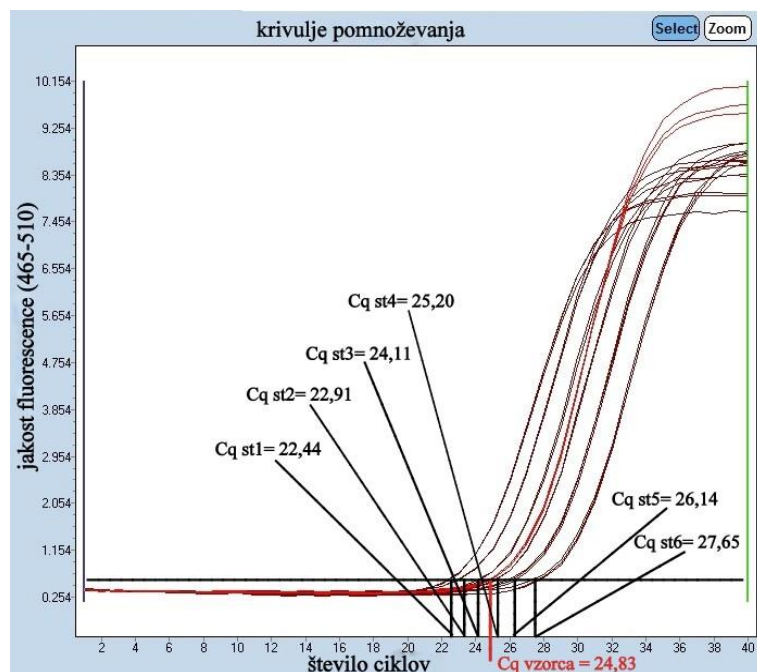
4.2.1 Optimizacija in testiranje pomnoževanja ali qPCR

Vse qPCR smo izvedli pod enakimi pogoji, ki smo jih predhodno optimizirali. Med predhodno optimizacijo smo izbrali primerne oligonukleotidne začetnike, določili optimalne koncentracije in volumne posameznih reagentov v reakcijski zmesi in program, po katerem je potekla reakcija. Naredili smo tudi talilno krivuljo, s katero smo preverili prisotnost nespecifičnih produktov in dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Njihova prisotnost bi zaradi izbranega barvila Eva Green, ki se nespecifično veže na vse dvoverižne DNA, lažno

povečala fluorescenco željenega produkta. Za referenčni gen smo na osnovi literaturnih podatkov izbrali albumin. Ker nismo mogli doseči ločene detekcije med genoma za albumin in telomere znotraj ene reakcije, smo namesto multipleksnega qPCR morali narediti 2 ločeni qPCR reakciji, eno v kateri smo pomnoževali albumin in drugo, v kateri smo pomnoževali telomere. Ti dve reakciji sta potekli ločeno na dveh mikrotitrskih ploščicah in sta se ločili le v vrsti dodanih oligonukleotidnih začetnikov in programu, po katerem sta potekali. Optimizaciji je sledilo testiranje pomnoževanja albumina in telomer. Pri tem smo na ločeni mikrotitrski ploščici nanесли iste razredčene vzorce izolirane DNA, standarde in kalibrator. Ker smo imeli veliko vzorcev, smo tak par nanosov morali ponoviti večkrat, da smo za vsak vzorec lahko določili njegovo pomnoževanje. S pomočjo LyghtCyclerja in detekcije produkta PCR preko Eva Greena smo za vsak vzorec odčitali povprečje Cq vrednosti triplikatov in standardno deviacijo. Način odčitavanja iz pomnoževalnih krivulj je prikazan na Slikah 5 in 6. Rezultati qPCR so zbrani v Prilogi B. Ker nam vrednost Cq sama po sebi ne pove dovolj, smo v nadaljevanju izvedli relativno kvantifikacijo z metodo standardne krivulje.



Slika 5: Krivulja pomnoževanja pri qPCR in odčitanje Cq standardov ali vzorca pri telomerah.



Slika 6: Krivulja pomnoževanja pri qPCR in odčitanje Cq standardov ali vzorca pri albuminu.

4.2.2 Relativna kvantifikacija z metodo standardne krivulje

Za prikaz rezultatov se pri uporabi metode qPCR za merjenje DT uporablja relativna kvantifikacija. Absolutna je možna le po hkratni izvedbi TRF, kjer preko primerjanja rezultatov lahko izpeljemo enačbo, preko katere izračunamo DT v bp. V nekaterih raziskavah za podajanje dolžine v bp uporabijo tudi že prej izpeljane enačbe, po katerih se iz rezultatov relativne kvantifikacije lahko izračuna dolžino telomer v bp, vendar nekateri opozarjajo, da tak način ni najbolj natančen (76, 91).

V naši raziskavi smo izbrali za pridobitev rezultatov relativno kvantifikacijo z metodo standardne krivulje. Rezultate smo podali relativno kot razmerje med preiskovanim vzorcem in kalibratorjem. Vrednosti vzorca in kalibratorja smo pred izračunom razmerja normalizirali glede na endogeni referenčni gen, s čimer smo izničili vpliv razlik v učinkovitosti qPCR med posameznimi vzorci in morebitnimi odstopanji v vhodni količini DNA. Normalizirane vrednosti smo dobili s pomočjo metode standardne krivulje. V vsaki seriji smo pripravili standardno krivuljo za tarčni in referenčni gen iz standardov različne koncentracije. Tako pridobljena krivulja predstavlja odvisnost Cq od log različnih koncentracij standardov. Iz teh krivulj smo preko Cq odčitali koncentracije za oba gena in izračunali normalizirane vrednosti tako, da smo izračunali kvocient med koncentracijo tarčnega in koncentracijo referenčnega

gena. Primernost standardnih krivulj za izvedbo normalizacije in primernost optimizacije qPCR smo ocenili preko linearnosti krivulj, učinkovitosti pomnoževanja, ponovljivosti učinkovitosti pomnoževanja in ponovljivosti meritev kalibratorja med krivuljami istega gena. Podatki za oceno standardnih krivulj so podani v Preglednici 5. Linearnost smo določili preko determinacijskega koeficienta (R^2). Učinkovitost pomnoževanja pa smo določili preko naklona standardnih krivulj po Enačbi 2.

Preglednica 5: Podatki o učinkovitosti pomnoževanja in linearnosti standardnih krivulj vsake od serij za oceno primernosti izvedbe qPCR in standardnih krivulj za izračun relativne DTL.

Številka serije	Albumin		Telomere	
	Učinkovitost pomnoževanja (%)	Linearnost (R^2)	Učinkovitost pomnoževanja (%)	Linearnost (R^2)
1.serija	96	0,997	76	0,998
2.serija	92	0,999	80	0,997
3. serija	99	0,997	78	0,998
4. serija	94	0,999	81	0,999
5. serija	103	0,996	77	0,999
6. serija	95	0,997	77	0,999
7.serija	90	0,996	77	0,998
8.serija	85	0,998	78	0,999

Enačba 2: Enačba za izračun učinkovitosti pomnoževanja preko naklona standardnih krivulj.

$$\% \text{ učinkovitosti pomnoževanja} = \left(10^{-\frac{1}{\text{naklon}}} - 1 \right) * 100$$

Ker so vse standardne krivulje imele $R^2 > 0,99$, smo lahko sklepali, da so vsi eksperimentalni rezultati ustrezali linearnosti krivulje. Takšna linearnost krivulj nam je povedala, da variabilnosti znotraj pomnoževanja iste začetne koncentracije vzorca skoraj ni bilo, in da je učinkovitost pomnoževanja bila enaka med različnimi začetnimi koncentracijami vzorca. Za razliko od linearnosti, učinkovitost pomnoževanja med obema genoma ni bila enaka. Učinkovitost pomnoževanja albumina je bila večja kot pri telomerah in znotraj željenih vrednosti 90–110 %, medtem ko je bila učinkovitost pomnoževanja telomer pod 90 %. Ponovljivost učinkovitosti pomnoževanja je bila večja pri telomerah kot albuminu, a pri obeh genih med posameznimi serijami primerna. Učinkovitost podvojevanja telomer pod 90 % kaže verjetno na neidealno izbiro oligonukleotidnih začetnikov, a ker je izbira le-teh zaradi ponovljivosti sekvenc telomer zelo omejena in so v literaturi skoraj izključno opisani

začetniki, ki smo jih uporabili tudi mi, je dosežena učinkovitost sprejemljiva. Izvedba qPCR je bila pod izbranimi pogoji zadovoljiva, saj je bila učinkovitost pomnoževanja telomer med različnimi serijami ponovljiva. Med različnimi serijami pa je bila ponovljiva tudi meritev kalibratorja, ki je potrdila tudi primerno ponovljivost rezultatov med posameznimi testiranimi ploščicami. Na podlagi ocene linearnosti standardnih krivulj, učinkovitosti pomnoževanja, ponovljivosti učinkovitosti pomnoževanja in meritev kalibratorja med različnimi serijami lahko rečemo, da je naša izvedba qPCR primerna, pridobljene standardne krivulje pa primerne za izračun željene povprečne relativne DTL.

4.3 OCENA POVEZANOSTI DOLŽINE TELOMER V LEVKOCITIH S KRONOLOŠKO STAROSTJO, REPRODUKTIVNIM STARANJEM IN NAČINOM ŽIVLJENJA POMENOPAVZNIH ŽENSK

Glavni namen naše raziskave je bil proučiti povezanost med DTL in izbranimi parametri, ki opredeljujejo staranje in način življenja. Parametri, ki smo jih vključili v analizo so bili: kronološka starost, starost ob menopavzi, leta mene, indeks telesne mase, obseg pasu, kajenje, fizična aktivnost/neaktivnost, ure telesne aktivnosti na teden ne glede na tip aktivnosti in z urami hoje/teka/kolesarjenja/plavanja/drugo na teden v vzorcu slovenskih pomenopavznih žensk.

Da bi lahko uporabili bolj statistično močne parametrične teste, smo na začetku želeli doseči normalno porazdelitev podatkov. V ta namen smo vse podatke najprej logaritemsko, kvadratno, korensko in recipročno transformirali in nato preverili normalnost porazdelitve podatkov vseh transformacij preko izvedbe Shapiro-Willk testa. Najbolj normalno porazdeljene podatke (p-vrednosti nad 0,05) je podajala logaritemska transformacija, ki smo jo uporabili pri nadaljnjih testih. Normalno so se porazdeljevale naslednje logaritemske transformacije: DTL, ITM in obseg pasu. Normalno je bila porazdeljena tudi DTL med vsemi med seboj primerjanimi skupinami. Vsi ostali logaritemsko transformirani podatki so se porazdeljevali nenormalno in smo v nadaljevanju pri njih uporabili neparametrične teste. Rezultati testa, oblika in pomaknjenost krivulj so prikazani v Prilogi C. V nadaljevanju smo povezanost ocenili preko več različnih testov, ki smo jih izbirali glede na porazdeljenost podatkov, vrsto podatkov in predvsem glede na namen statističnega preizkušanja. Splošne značilnosti preiskovank so prikazane v Preglednici 6.

Preglednica 6: Splošne značilnosti preiskovanega vzorca slovenskih pomenopavznih žensk.

	Kronološka starost	Starost ob menopavzi	Leta mene	ITM	Obseg pasu	Zdaj kadilci	
N	275	262	262	275	265	DA	NE
Povprečje	67	49,6	16,8	27,7	90,75	N=30	N=240
SD	9,429	4,197	10,025	5,192	12,383		
Mediana	68	50	17	27,1	89	Fizično aktivni	
Q1	59	47	8	23,9	80	DA	NE
Q3	74	53	25	30,48	98,5	N=181	N=54

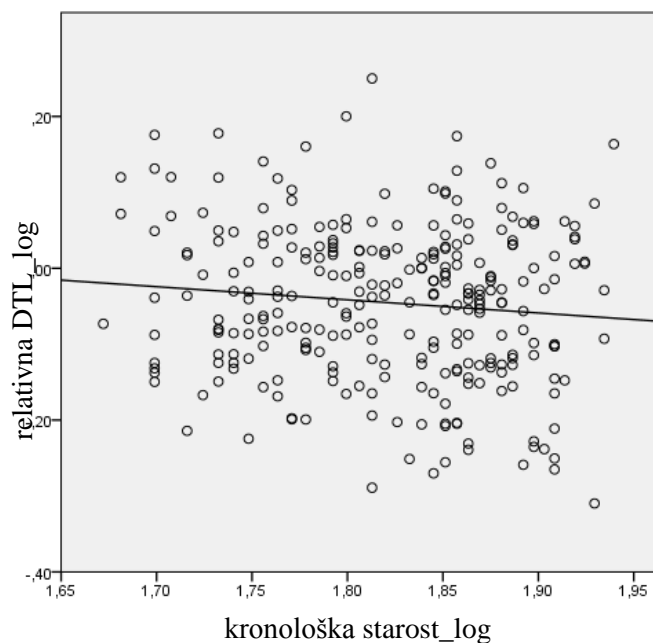
4.3.1 Povezanost dolžine telomer v levkocitih s kronološko starostjo

Raziskave staranja, iskanje bioloških označevalcev za zgodnejšo prepoznavo bolezni staranja in tarč za učinkovitejše zdravljenje tovrstnih bolezni so ključne za prihodnje spopadanje s povečanim številom s starostjo povezanih kroničnih bolezni zaradi vedno večjega deleža starejšega prebivalstva. V tovrstne raziskave sodijo tudi raziskave povezanosti staranja in DT, saj so telomere preko svojega skrajševanja teoretično lahko vpletene v različne mehanizme staranja in bolezni staranja. V naši raziskavi smo želeli preučiti, ali obstaja pomembna statistična povezava med staranjem in DT znotraj našega vzorca pomenopavznih žensk, ki predstavljajo rizično skupino za razvoj s starostjo povezanih CVD in osteoporozo. S tem namenom smo si za indikator staranja izbrali kronološko starost in gledali njeno povezanost z izmerjeno vrednostjo relativne DTL. Povprečna starost preiskovank je bila 67 let s standardnim odklonom 9,4. Vse vrednosti kronološke starosti so bile v razponu od 47 do 87 leta. Ker smo imeli na voljo tako podatek o relativni DTL kot tudi kronološko starost za vse udeleženske, smo teste lahko naredili na 275 vzorcih. Povezanost spremenljivk smo preverili z dvema testoma: Spearmanovim dvostranskim neparametričnim testom in linearno regresijo. Preko Spearmanovega dvostranskega neparametričnega testa smo preverili prisotnost povezanosti spremenljivk, njun odnos pa smo podrobneje v nadaljevanju pogledali še z linearno regresijo. Oba testa ocenjujeta linearno povezanost in smo ju izbrali, ker smo želeli dokazati negativno linearno povezanost relativne DTL s kronološko starostjo, o kateri so poročali v dosedanjih člankih (13, 24). Rezultate testov prikazujeta Preglednica 7 in Slika 7.

Iz rezultata Spearmanovega dvostranskega neparametričnega testa je razvidno, da je v našem vzorcu med relativno DTL in kronološko starostjo prisotna zelo šibka negativna linearna povezanost ($p = -0,078$), ki pa ni statistično pomembna ($p > 0,05$). Za razliko od rezultatov Spearmanovega dvostranskega neparametričnega testa rezultati linearne regresije ($p < 0,1$),

Preglednica 7: Rezultati testov povezanosti relativne DTL s kronološko starostjo.

	Relativna DTL	Kronološka Starost
N	275	275
Povprečje	0,926	67
SD	0,217	9,429
Mediana	0,919	68
Q1	0,759	59
Q3	1,062	74
Min	0,490	47
Max	1,779	87
Spearmanova Korelacija	ρ	-0,078
	p	0,199
Linearna regresija	b1	-0,173
	b0	0,270
	R ²	0,011
	p	0,077



Slika 7: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL s kronološko starostjo.

kažejo na mejno statistično povezanost. Iz naklona ($b_1 = -0,173$) premice in grafa linearne regresije je razviden tudi trend med spremenljivkama, ki je, tako kot nakazuje že Spearmanov koeficient, negativen. Poleg tega nam R^2 vrednost pove, da je 1,1% variabilnosti v relativni DTL pojasnjene z linearno odvisnostjo DTL od kronološke starosti. Iz rezultatov obeh testov lahko sklepamo, da obstaja statistično nepomembna oziroma mejno statistično pomembna zelo šibka negativna linearna povezava znotraj našega vzorca pomenopavznih žensk, ki nakazuje na obratno sorazmerno povezanost spremenljivk oziroma na to, da se DT skrajšuje s kronološko starostjo. Takšni rezultati so presenetljivi, saj je statistična negativna linearna povezanost kronološke starosti z DT že skoraj splošno sprejeto dejstvo (24). Vzroki za mejno statistično povezanost v našem vzorcu pomenopavznih žensk so lahko: neupoštevanje drugih dejavnikov, ki vplivajo na DT, ozko usmerjen vzorec preučevanja (le ženske po menopavzi), majhen razpon v starosti preiskovank in premajhno število preiskovank, da bi lahko dokazali statistično pomembno povezanost že tako znane šibke povezanosti. Kljub temu, da je bila naša povezava le mejno statistična, smo skladno z drugimi raziskavami ugotovili trend šibke negativne linearne povezave in veliko interindividualno variabilnost v DT med preiskovankami enake kronološke starosti (13, 24). Poleg tega smo tako kot v drugih raziskavah ugotovili, da lahko zelo majhen delež interindividualne variabilnosti v DT

pojasnimo s povezavo s kronološko starostjo in da je ta variabilnost odraz tudi drugih, do sedaj še ne popolnoma znanih dejavnikov, ki jih pri analizi nismo upoštevali. Večina raziskav do sedaj upošteva kot kovariate pri raziskovanju te povezanosti le raso in spol (dejavnika, ki poleg kronološke starosti najpogosteje dajeta konsistentne rezultate povezanosti z DT). Njun vpliv smo pri našem raziskovanju upoštevali že s samo izbiro vzorca žensk bele rase (8). Ker kronološka starost ni najboljši indikator biološkega staranja, biološko staranje pa je tisto, ki bi ga želeli napovedovati in zavirati, bi lahko za nadaljevanje preučevanja vključili tudi druge indikatorje staranja (npr. upad pljučne funkcije, zmanjšanje moči prijema, zvečanje krvnega pritiska, zmanjšanje kognitivnih zmožnosti). V nadaljevanju smo želeli preveriti še druge vidike staranja (reproduktivno staranje), da bi morda preko njih ugotovili klinično pomembnost DT v vzorcu pomenopavznih žensk.

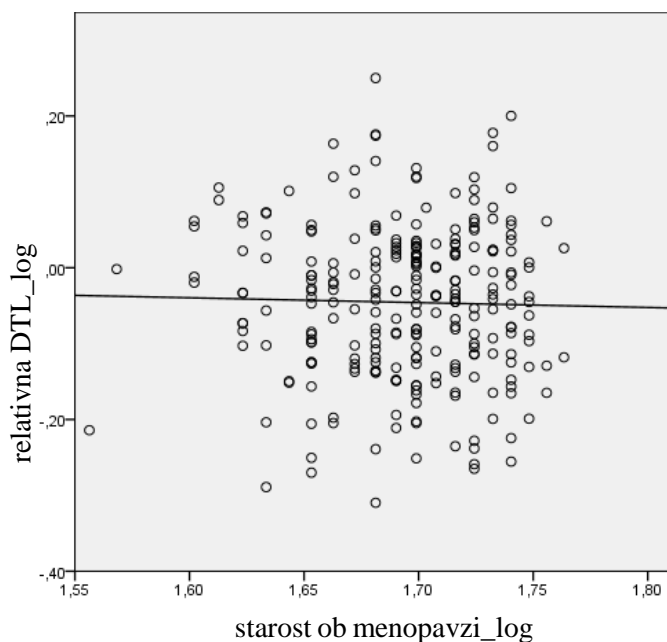
4.3.2 Povezanost dolžine telomer v levkocitih z reproduktivnim staranjem žensk

Raziskave reproduktivnega staranja žensk so pomembne za prihodnost zdravljenja vedno bolj razširjene neplodnosti in za učinkovitejše spopadanje zdravstva s spremembami, povezanimi s prehodom v menopavzo. S takšnimi raziskavami bi našli način podaljšanja kakovosti življenja žensk tudi v pomenopavznem obdobju, v katerem bo zaradi staranja prebivalstva vedno večji odstotek žensk. Del pomembnih raziskav reproduktivnega staranja, ki se izvajajo v populaciji žensk po menopavzi, predstavljajo tudi raziskave iskanja bioloških označevalcev reproduktivnega staranja žensk. Z njimi bi znali napovedovati začetek menopavze in tveganje za razvoj z menopavzo povezanih bolezni ter s tem hitreje in učinkoviteje začeli z zdravljenjem tovrstnih bolezni ali našli način za zmanjševanje z menopavzo povezanega povečanja tveganja za CVD, ki so glavni vzrok smrti žensk v obdobju po menopavzi. Eden izmed potencialnih označevalcev začetka reproduktivnega staranja je tudi DT, saj lahko odseva začetno DT v izvornih spolnih celicah in določa njihov potencial delitve. Preko tega vpliva na število foliklov ter njihovo izpraznitev, ki se kaže v pojavu menopavze. Da bi to teorijo lahko potrdili, bi morala obstajati pozitivna statistično pomembna povezava med DT in starostjo ob menopavzi, ki bi daljše telomere povezovala z večjo starostjo ob menopavzi zaradi večje zmožnosti deljenja izvornih spolnih celic in kasnejše izpraznitve zaloge foliklov. Zato smo v okviru naše raziskave za indikator reproduktivnega staranja izbrali starost ob menopavzi. Nato smo DTL povezovali še z leti mene in tako preverili, ali lahko leta mene preko različnih vzorcev padca estrogenov vplivajo na DT in bi jih posledično morali

upoštevati tudi pri povezovanju DTL s starostjo ob menopavzi. Oba indikatorja reprodukativnega staranja smo z DTL povezovali na enak način kot DTL s kronološko starostjo: preko Spearmanovega dvostranskega neparametričnega testa in linearne regresije.

Preglednica 8: Rezultati testov povezanosti relativne DTL s starostjo ob menopavzi.

	Relativna DTL	Starost ob menopavzi
N	262	262
Povprečje	0,925	49,6
SD	0,215	4,197
Mediana	0,918	50
Q1	0,761	47
Q3	1,057	53
Min	0,490	36
Max	1,779	58
Spearmanova korelacija	ρ	-0,025
	p	0,690
Linearna regresija	b1	-0,064
	b0	0,063
	R ²	0,002
	p	0,699



Slika 8: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL s starostjo ob menopavzi.

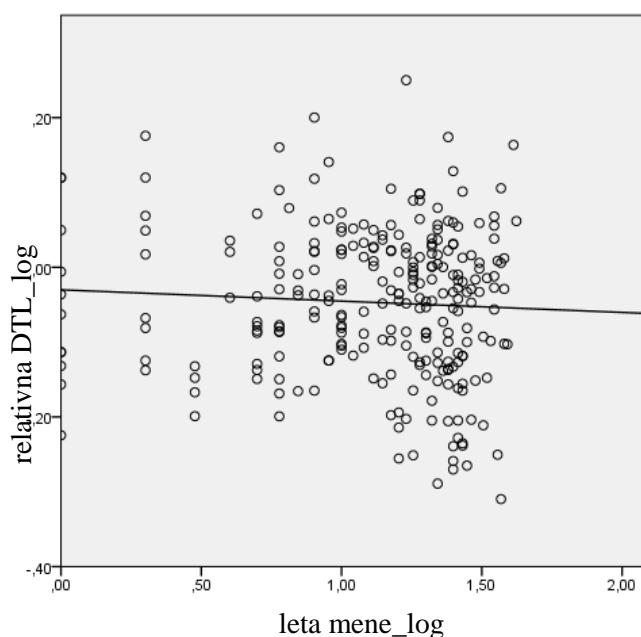
Povprečje starosti preiskovank ob menopavzi je bilo 50 let s standardnim odklonom 4,2. Najnižja starost ob menopavzi našega vzorca je bila 36, najvišja pa 58. 53 preiskovank je v menopavzo vstopilo zgodaj (starost ob menopavzi <45 let), od tega so 4 preiskovanke vstopile prezgodaj (starost ob menopavzi <40 let). Za 12 preiskovank podatka o začetku menopavze kot tudi letih mene nismo imeli, enega podatka od 4 preiskovank, ki so vstopile v menopavzo prezgodaj, nismo upoštevali pri statističnih testih, saj se je izkazalo, da je vzrok njene prezgodnje menopavze (starost ob menopavzi 22 let) kirurško povzročena menopavza. Tako smo zaradi želje oceniti le povezavo DT z starostjo ob naravni menopavzi statistične teste lahko izvedli na 262 vzorcih.

Na podlagi visokih p-vrednosti rezultatov obeh testov ($p > 0,6$) povezovanja DTL z starostjo ob menopavzi (Preglednica 8 in Slika 8) lahko rečemo, da nismo našli klinično pomembne povezave oziroma, da povezave med relativno DTL s starostjo ob menopavzi v našem vzorcu ni. Tako naši rezultati ne podpirajo teze, da je DT napovedovalec starosti, pri kateri bodo

ženske dosegle konec reproduktivnega obdobja preko teorije vpliva DT na število izvornih foliklov. Takšni rezultati niso presenetljivi, saj tudi rezultati drugih raziskav z vzorcem žensk bele rase velikokrat tovrstne povezave ne najdejo (37, 45, 53) ali pa najdejo zelo šibko pozitivno linearno povezavo (17, 29, 35). Poleg tega slednje raziskave kljub statistično pomembni povezavi zaradi različnosti te povezave med različnimi rasami ne podajajo dokaza o DT kot splošnem napovedovalcu reproduktivnega staranja, ampak morda le dokaz za potencialnost napovedovalca pri nekaterih rasah (35). P-vrednosti naše raziskave so nekoliko višje kot pri drugih raziskav na vzorcu belk, ki te povezanosti niso našle. Vzroki za višjo vrednost v naši raziskavi je lahko uporaba qPCR, ki je manj natančen od metode TRF, neupoštevanje vpliva kronološke starosti na DT in manjše število preiskovank. Te vzroki bi lahko bili tudi posledica, da nismo našli statistično pomembne povezave. Da bi na nek način preverili, ali je vzrok naših rezultatov lahko neupoštevanje vpliva kronološke starosti na DT, smo v nadaljevanju povezovali DTL tudi z leti mene.

Preglednica 9: Rezultati testov povezanosti relativne DTL z leti mene.

	Relativna DTL	Leta mene
N	262	262
Povprečje	0,925	16,8
SD	0,215	10,025
Mediana	0,918	17
Q1	0,761	8
Q3	1,057	25
Min	0,490	0
Max	1,779	42
Spearmanova Korelacija	P	-0,059
	P	0,338
Linearna regresija	b1	-0,015
	b0	-0,030
	R ²	0,003
	P	0,349



Slika 9: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL z leti mene.

Povprečno število let mene našega vzorca je bilo 16,8 s standardnim odklonom 10,0. Vrednosti so se raztezale od 0 do 42 let od menopavze. Teste smo izvedli na enakem številu preiskovank kot pri testiranju povezave starosti ob menopavzi z DT. Rezultate povezanosti DTL z leti mene prikazujeta Preglednica 9 in Slika 9. Iz rezultatov je razvidno, da nismo našli statistično pomembne povezave. Tako naši rezultati kažejo, da leta mene preko različnih

vzorcev padca estrogena ne vplivajo na izmerjeno vrednost DTL znotraj našega vzorca pomenopavznih žensk. Posledično neupoštevanje let mene pri našem povezovanju DTL in starosti ob menopavzi ni vzrok, da nismo dobili statistično pomembnih rezultatov. Naši rezultati se skladajo z rezultati do sedaj izvedenih raziskav te povezanosti, ki kažejo, da statistično pomembne povezave med DTL in leti mene ni (18–17). To pomeni, da je razlika v vzorcih padca estrogena med različnimi preiskovankami verjetno premajhna, da bi te vzorci preko potencialne vloge estrogena pomembno vplivali na DT.

Na podlagi naših rezultatov povezovanja DTL z obema indikatorjema reproduktivnega staranja in rezultatov drugih podobnih dosedanjih raziskav lahko zaključimo, da dokončnega odgovora glede DT kot reproduktivnega označevalca še nimamo. Vzrok za to je v prihodnosti smiselno iskati v drugih možnih vzrokih, ki jih navajajo tudi raziskave, katere so našle statistično pomembno povezavo preko povezovanja starosti ob menopavzi in DT. Te npr. opozarjajo, da je pomemben tudi način pridobivanja indikatorjev reproduktivnega staranja, saj preiskovanke ne ločijo med naravno menopavzo in umetno povzročeno menopavzo (29). Tako je na naš rezultat lahko vplival tudi način pridobivanja podatkov o starosti ob menopavzi preko anamneze, kjer ni nujno, da jim je bilo vprašanje o vzroku menopavze res zastavljeno. Posledično imamo lahko v statistično testiranje vključenih več preiskovank z umetno povzročeno menopavzo, ki zmanjšujejo možnost za statistično pomemben rezultat, saj v raziskavah, pri katerih so našli povezavo med naravno menopavzo in DT, niso našli povezave med umetno povzročeno menopavzo in DT (29, 45).

4.3.3 Povezanost dolžine telomer v levkocitih z debelostjo

Raziskave debelosti so pomembne z vidika ozaveščanja in osveščanja prebivalstva o pozitivnem vplivu zdravega načina življenja na razvoj kroničnih bolezni, saj debelost štejemo med pomemben dejavnik tveganja za njihov razvoj. Del teh raziskav, ki bi lahko dodatno potrdile pomembnost preventivnega izvajanja zdravega načina življenja, predstavljajo tudi raziskave povezave debelosti z DT. Povezanost debelosti z DT je teoretično možna preko vnetja in oksidativnega stresa, ki sta vpletena tako v patologijo debelosti kot tudi v skrajševanje telomer (64–65). Poleg tega na možnost njune povezanosti kažejo tudi izsledki nekaterih raziskavah, ki so poročale o povezanosti dolžine telomer s tveganjem za bolezni, pri katerih debelost štejemo za dejavnik tveganja (8, 19). Z namenom, da bi preučili možno povezanost debelosti z DT tudi znotraj našega vzorca slovenskih pomenopavznih žensk, smo

si izbrali 2 indikatorja debelosti: indeks telesne mase in obseg pasu ter ocenili njuno povezanost z izmerjeno relativno DTL .

Najprej smo povezovali ITM z DTL, ker je ITM eden izmed najpogosteje uporabljenih indikatorjev debelosti v klinični praksi. Poleg tega je tudi najpogosteje uporabljen indikator za oceno debelosti tudi pri drugih že izvedenih raziskavah povezanosti debelosti z DT. Določili smo ga z izračunom razmerja med telesno maso v kilogramih in kvadratom telesne višine v metrih in preko izračunane vrednosti določili stopnjo debelosti znotraj našega vzorca po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO).

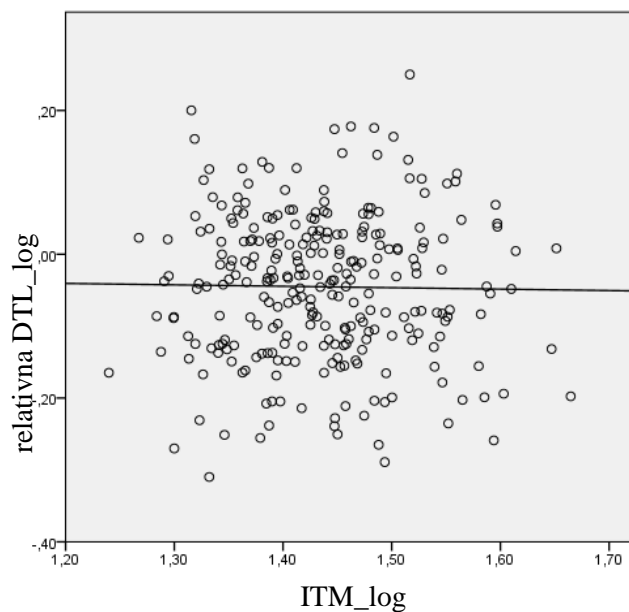
Preglednica 10: Razvrstitev preiskovank glede na ITM po kriterijih SZO.

ITM (kg/m ²)	Klasifikacija po SZO	Število preiskovank	% preiskovank
< 18,5	Podhranjenost	1	0,4 %
18,5-24,9	Normalna telesna teža	97	35,3 %
25,0-29,9	Prekomerna telesna teža	99	36,0 %
30,0-34,9	Debelost 1. stopnja	49	17,8 %
35,0-39,9	Debelost 2. stopnja	23	8,3 %
40-50	Morbidna debelost	6	2,2 %
>50	Ekstremna debelost	0	0 %

Iz Preglednice 10 je razvidno, da je največ preiskovank imelo prekomerno telesno težo, 78 preiskovank pa je bilo debelih. Ker smo lahko izračunali ITM za vse preiskovanke, smo statistične teste izvedli na celotnem vzorcu. Rezultati povezanosti, ki smo jo ocenili preko Pearsonovega dvostranskega neparametričnega testa in linearne regresije, so podani v Preglednici 11. Rezultati Pearsonove korelacije ($r = -0,015$, $p=0,799$) in linearne regresije ($p=0,799$) kažejo, da statistično pomembne povezave med ITM-jem in relativno DTL znotraj našega vzorca slovenskih pomenopavznih žensk ni. Ker bi vzrok za tovrsten rezultat lahko iskali tudi v tem, da ITM ni najboljši indikator debelosti po 65. letu (kar predstavlja večino našega vzorca) (92), smo DTL v nadaljevanju povezovali tudi z obsegom pasu. Vzrok, da ITM ni najboljši indikator v tem obdobju, je v tem, da v tem obdobju pride do izgube mišic, kostne gostote in višine, ki lahko zmanjšajo ITM, kljub povečanju količine maščevja. Obseg pasu smo izbrali tudi zato, ker preko njega lahko natančneje kot z ITM ocenimo ogroženost za srčno-žilne in presnovne zaplete, povezane z debelostjo, saj je povezan s količino visceralnega maščevja, katero je večinoma odgovorno za omenjene zaplete.

Preglednica 11: Rezultati testov povezanosti relativne DTL z ITM.

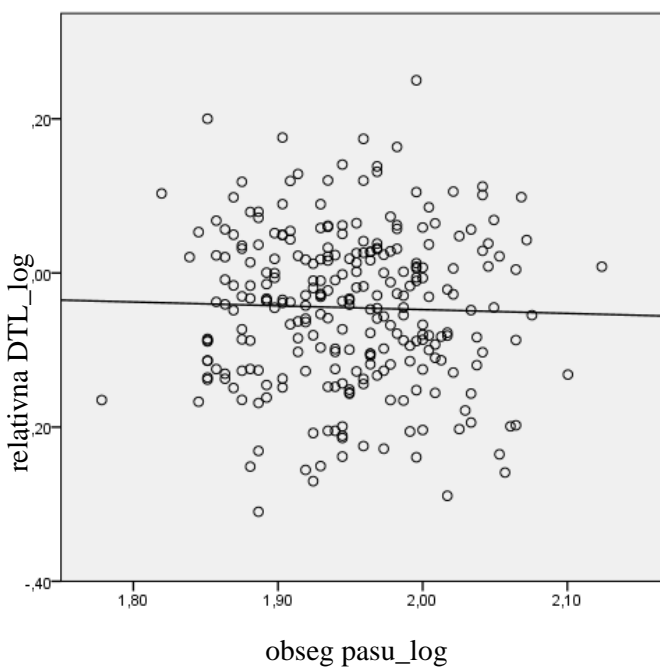
	Relativna DTL	ITM
N	275	275
Povprečje	0,926	27,7
SD	0,217	5,192
Mediana	0,919	27,1
Q1	0,759	23,9
Q3	1,062	30,48
Min	0,490	17,37
Max	1,779	46,20
Pearsonova Korelacija	r	-0,015
	p	0,799
Linearna regresija	b1	-0,020
	b0	-0,017
	R2	0,000
	p	0,799



Slika 10: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL z ITM.

Preglednica 12: Rezultati testov povezanosti relativne DTL z obsegom pasu.

	Relativna DTL	Obseg pasu
N	265	265
Povprečje	0,925	89,75
SD	0,212	12,383
Mediana	0,920	89
Q1	0,761	80
Q3	1,062	98,5
Min	0,490	60
Max	1,779	133
Pearsonova Korelacija	r	-0,290
	p	0,634
Linearna regresija	b1	-0,049
	b0	0,051
	R2	0,001
	p	0,634



Slika 11: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL z obsegom pasu.

Povezanost DTL z obsegom pasu smo ocenili na 265 vzorcih, za katere smo imeli podatek o obsegu pasu ter izvedli testa povezanosti, katerih rezultati so podani v Preglednici 12, razpršenost podatkov in trend povezanosti pa sta prikazana na Sliki 11. Rezultata obeh testov

kažeta na šibki negativni linearni trend povezanosti ($r=-0,290$, $b1=-0,049$), ki pa tudi tu, tako kot pri povezovanju z ITM ni statistično pomemben.

Naši rezultati povezovanja obeh indikatorjev debelosti z DTL tako kažejo, da povezave med debelostjo in DT znotraj našega vzorca ni. Takšni rezultati niso presenetljivi, saj so rezultati med preteklimi raziskavami te povezanosti, tako preko povezovanja DT z ITM (92) ali z obsegom pasu (40, 66), nekonsistentni. Nekatere raziskave povezanosti ITM z DT kažejo na statistično pomembno zelo šibko do srednje močno obratno linearno povezanost (40, 65, 66, 70, 93, 94,), medtem ko rezultati drugih, tako kot naši, te povezave ne kažejo (39, 46, 47, 57, 95). Prav tako nekatere raziskave povezanosti obsega pasu z DT podajajo statistično pomembno zelo šibko do šibko obratno povezavo (66, 70, 93), medtem ko je druge povezave ne navajajo (40, 47, 95). Mešani rezultati so prisotni tako znotraj celotne populacije pri povezovanju z ITM (66, 95) in obsegom pasu (66, 70, 95), kot samo med ženskami z ITM (57, 65, 70, 93, 94, 95) in obsegom pasu (40, 47, 70, 93, 95). V literaturi smo za pomenopavzne ženske našli 5 raziskav proučevanja povezanosti DT z ITM (40, 46, 47, 39, 65), za obseg pasu pa le 3 (40, 47, 65). Med raziskavami, ki so raziskovale povezanost DT z ITM v populaciji pomenopavznih žensk, kar 4, tako kot naša, niso našle povezave (39, 46, 47, 65). V nasprotju z njimi je 1 raziskava poročala šibko obratno povezanost (40). Slednja raziskava se od ostalih razlikuje po metodi merjenja DT (TRF) in preučevani populaciji (Korejke). Med naštetimi 3 raziskavami povezanosti obsega pasu z DT pa nobena raziskava, tako kot naša, povezave ni našla. Povezanost obsega pasu z DT v naši raziskavi je kljub različnemu številu preiskovank in metodi merjenja skoraj identična edini raziskavi v vzorcu pomenopavznih žensk, ki je tudi podala Pearsonov koeficient korelacije (40). Povezanost znotraj naše raziskave, ki jo izkazuje obseg pasu, je večja kot povezanost z ITM-jem, kar je lahko posledica prej opisanega zmanjšanja zmožnosti ITM za določanje debelosti po 65. letu starosti. Na podlagi dosedanjih raziskav z obema indikatorjema debelosti, vključno z našo, lahko sklepamo, da povezanosti obsega pasu/ITM-ja/debelosti z DT v vzorcu pomenopavznih žensk ni.

Ker edini sistematični pregled povezanosti ITM z DT, kljub zaznani veliki nekonsistentnosti med rezultati raziskav, poroča o večjem deležu raziskav s statistično pomembnim obratnim trendom povezanosti, njegova meta analiza pa potrjuje obratni odnos s statistično pomembnostjo, lahko kljub našemu rezultatu sklepamo, da potencialno lahko obstaja povezanost ITM/obsega pasu/debelosti in DT, a verjetno le znotraj določenih vzorcev populacije (znotraj vzorca pomenopavznih žensk po dosedanjih raziskavah verjetno ne).

Znotraj določenih populacij predvsem zato, ker vzroke za nekonsistentnost rezultatov lahko iščemo predvsem v njihovi starostni strukturi (povezanost močnejša pri mlajših), spolu preiskovancev, različnem številu vključenih preiskovancev, upoštevanju različnih dodatnih dejavnikov, ki vplivajo na DT, samoocenjevalnih vprašalnikih, različnih metodah merjenja DT in merjenju DT v različnih bioloških vzorcih (92).

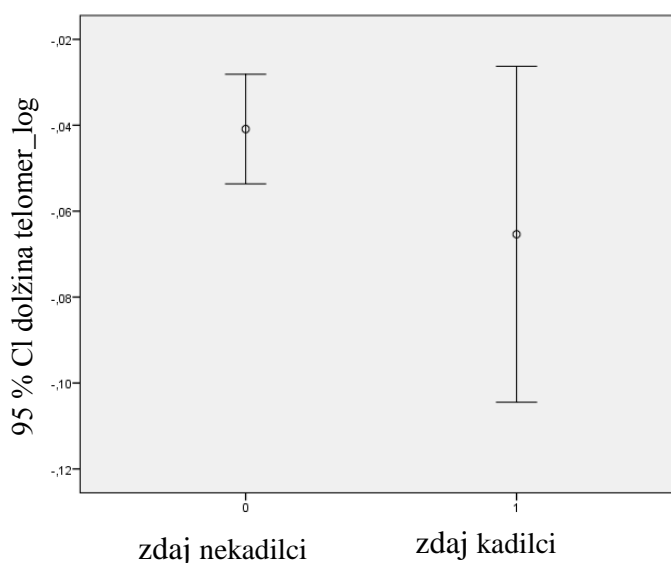
4.3.4 Povezanost dolžine telomer v levkocitih s kajenjem

Kajenje je tako kot debelost eden izmed dejavnikov načina življenja, ki preko povzročanja in pospeševanja vnetja ter oksidativnega stresa lahko pospeši skrajševanje telomer. Posledično pospeši proces biološkega staranja ter preko tega poveča tveganje za razvoj kroničnih starostnih bolezni. Dokaz te povezanosti bi bil pomemben za dodatno potrditev vpliva kajenja na razvoj bolezni, škodljivosti kajenja med nosečnostjo na razvoj plodu in škodljivosti sekundarnega kajenja. Z namenom, da bi preučili opisano potencialno povezanost kajenja z izmerjeno relativno DTL, smo preiskovani vzorec razdelili na 5 skupin: zdaj nekadilci, zdaj kadilci, nikoli kadilci, kadarkoli kadilci in nekdanji kadilci. Podatek o statusu kajenja smo imeli za 270 preiskovank. 240 preiskovank se je opredelilo za nekadilke (zdaj nekadilci) in 30 za kadilke (zdaj kadilci). Od trenutno 240 nekadilk je včasih kadilo 20 preiskovank (nekdanji kadilci). Testiranje smo izvedli v treh sklopih s 3 različnimi testi: Spearmanovim dvostranskim neparametričnim testom, t-testom za neodvisne vzorce in ANCOVO. Pri vseh izvedenih t-testih smo predhodno dosegli njegovo predpostavko o homogenosti varianc, prav tako smo za vse izvedene ANCOVA teste dosegli neodvisnost kovariat in skupin ter homogenost regresijskih naklonov.

V okviru 1. sklopa testiranja smo želeli pogledati, ali je prisotna razlika v DTL med skupinama kadilk in nekadilk oziroma ali imajo nekadilke daljše telomere kot kadilke. V okviru 2. sklopa smo preverili, ali je prisotna razlika med skupinama nikoli kadilci in kadilci. V zadnjem sklopu pa smo preko ocenjevanju razlik DTL med skupinama zdaj kadilci in nekdanjimi kadilci skušali preveriti, kako prenehanje kajenja vpliva na DTL. Rezultati testov so prikazani v Preglednici 13 s pripadajočimi Slikami 12, 13, 14 in Preglednici 14.

Preglednica 13: Rezultati povezanosti DTL med različnimi skupinami kadilcev.

		1.sklop		2.sklop		3.sklop	
		Zdaj nekadilci	Zdaj kadilci	Nikoli kadilci	Kadarkoli kadilci	Zdaj kadilci	Nekdanji kadilci
N		240	30	220	50	30	20
Povprečje		0,935	0,884	0,929	0,925	0,884	0,987
SD		0,217	0,207	0,217	0,218	0,207	0,226
Razlika v povprečju		$\beta=-0,051$		$\beta=-0,004$		$\beta=0,103$	
Spearmanova korelacija		$\rho = -0,060$ $p=0,322$		$\rho=-0,004$ $p=0,952$		$\rho=0,198$ $p=0,168$	
t-test za neodvisne vzorce		t=1,254 p=0,211		t=0,170 p=0,865		t=-1,599 p=0,116	
ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	F=3,057 p=0,051		F=1,895 p=0,152		F=2,349 p=0,107	
	Vpliv starosti	F=4,541 p=0,034		F=3,753 p=0,054		F=2,211 p=0,144	
	Sprememba povezave po upoštevanju starosti	F=2,657 p=0,104		F=0,210 p=0,647		F=3,732 p=0,059	



Slika 12: Prikaz rezultata t-testa 1. sklopa preizkušanja med skupinama zdaj nekadilci in zdaj kadilci.

Razlika povprečij skupin ($\beta=-0,051$) in Spearmanov koeficient ($\rho = -0,060$) **1. sklopa** kažeta, da je bila DTL v skupini kadilk nekoliko krajša kot pri skupini nekadilk, kar je skladno s teorijo skrajševanja telomer preko kajenja. Čeprav je prisoten željen trend, rezultati Spearmanove korelacije, t-testa in hi-kvadrat testa (Preglednica 14) kažejo, da zaznan trend ni statistično pomemben ($p>0,05$). Rezultat t-testa je razviden tudi iz Slike 12. Iz Slike 12 je tudi razvidno, da je bilo znotraj našega vzorca statistično pomemben trend zelo težko dobiti,

saj je razpon intervala zaupanja pri skupini zdaj kadilci dosti večji kot pri zdaj nekadilci. Zaradi tega bi bilo v nadaljevanju raziskovanja smiselno upoštevati tudi intenziteto kajenja, saj intenziteta lahko vpliva na DT (večja intenziteta, krajše telomere). Rezultati tako kažejo, da povezanosti med izbranim statusoma kajenja z DTL ni, oziroma z drugimi besedami, da ima znotraj našega vzorca kajenje premajhen vpliv na skrajševanje telomer, da bi lahko potrdili povezanost kajenja z DT. Zaradi predhodnih raziskav, ki so konsistentno poročale o vplivu kronološke starosti na DTL, smo preko ANCOVE preverili tudi vpliv starosti na to povezavo. Izkazalo se je, da upoštevanje starosti poveča statistično povezanost, vendar še vedno ne dovolj, da bi postala preiskovana povezava statistično pomembna.

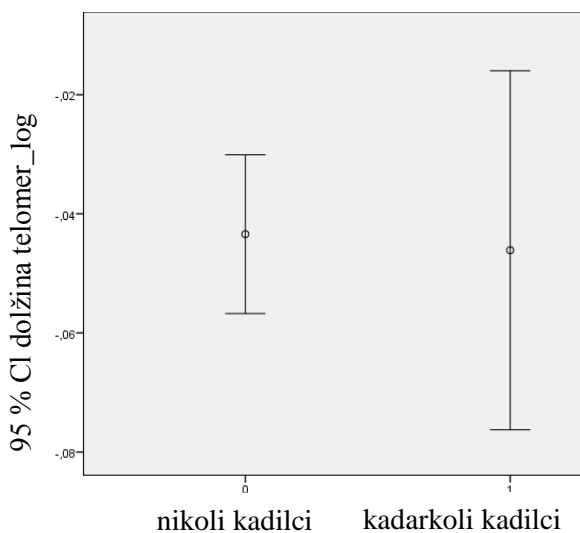
Preglednica 14: Rezultati hi-kvadrat testa 1. sklopa med skupinama zdaj nekadilci in zdaj kadilci.

	Zdaj nekadilci	Zdaj kadilci
1=najkrajše telomere	56 (58,7%)	10 (7,3%)
2	62 (60,4%)	6 (7,6%)
3	59 (60,4%)	9 (7,6%)
4=najdaljše telomer	63 (60,4%)	5 (7,6%)
Skupaj	240	30
Hi-kvadrat test	$\chi^2=2,734$ $p=0,434$	

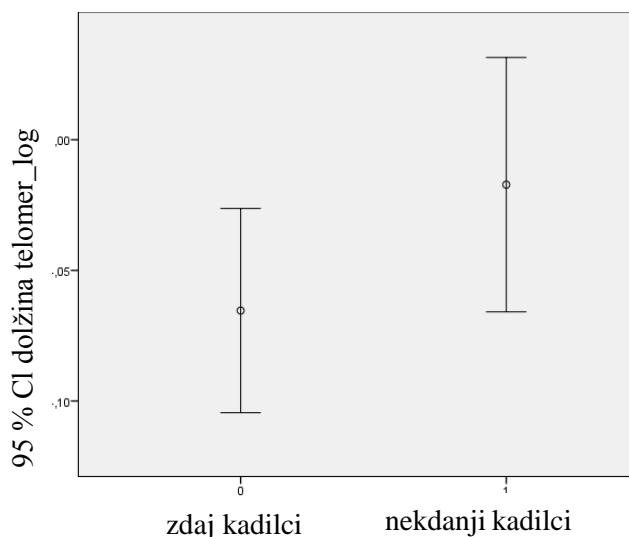
Rezultati izvedenih testov **2. sklopa** ($p>0,05$) kažejo, da tudi med tema izbranimi skupina in DTL ni statistično pomembne povezave. Tudi po upoštevanju starosti se statistična pomembnost ni spremenila. Vrednost Spearmanovega koeficienta in razlike povprečij (skoraj 0) nakazujeta, da za razliko od njunih vrednosti pri 1. sklopu tu praktično ni razlike med DTL med tistimi, ki nikoli niso kadile in tistimi, ki so kadarkoli kadile. To je dobro razvidno tudi iz priložene Slike 13, saj se njuni aritmetični sredini skoraj pokrivata. Glede na primerjavo rezultatov 1. in 2. sklopa lahko rečemo, da nekdanji kadilci, ki jih upoštevamo pri 1. sklopu pomembno prispevajo k razliki v trendu med 1. in 2. sklopom.

Spearmanov koeficient korelacije in razlika v povprečju (>0) **3. sklopa** nakazujeta, da je bila DTL nekdanjih kadilk šibko večja od trenutnih kadilk. Vendar na podlagi p-vrednosti korelacije in t-testa ($p>0,05$) ne moremo reči, da je ta zaznana razlika med skupinama statistično pomembna. Rezultat t-testa je razviden tudi iz Slike 14, kjer sta aritmetični sredini skupin dokaj narazen, a se kraka intervala zaupanja vseeno prekrivata. Po upoštevanju starosti

pa se je statistična razlika med skupinama toliko izboljšala, da je razlika med skupinama postala mejno statistično pomembna. Na podlagi rezultatov 3. sklopa lahko rečemo, da smo našli mejno statistično pomembno povezanost med DTL znotraj te skupine, kar pomeni, da prenehanje kajenja lahko potencialno dobro vpliva na DT.



Slika 13: Prikaz rezultata t-testa 2. sklopa preizkušanja med skupinama nikoli kadilci in kadarkoli kadilci.



Slika 14: Prikaz rezultata t-testa 3. sklopa preizkušanja med skupinama zdaj kadilci in nekdanji kadilci.

Glede na povprečje znotraj vseh testiranih skupin imajo najdaljše telomere nekdanje kadilke, sledijo jim trenutne nekadilke, najkrajše pa imajo trenutne kadilke. Takšen vrstni red je glede na dosedanje raziskave presenetljiv, saj več dosedanjih raziskav podpira trditev, da imajo najdaljše telomere nekadilci, sledijo jim nekdanji kadilci, najkrajše pa imajo kadilci (62). Ker na DT lahko vplivata intenziteta in čas kajenja nekdanjih kadilk in čas pretečen od prenehanja kajenja (62, 76, 77, 79), mi pa tovrstnega podatka nismo imeli, dokončnega razloga za tovrstno razliko ne moremo podati. Lahko pa sklepamo, da je vzrok lahko blaga oksidativna poškodba telomerne DNA sekvence, povzročena preko občasnega rahlega kajenja. Takšna oksidativna poškodba lahko zmanjša prijetost telomernih proteinov, zaradi česar se lahko prostorska ureditev telomer spremeni do te mere, da omogoči dostop telomerazi in preko tega omogoči podaljševanje telomer (80). Če so se torej v našem vzorcu ženske, ki občasno kadijo, preko samoocenjevalnih vprašalnikov označile za nekdanje kadilke, je rahlo daljša povprečna DT nekdanjih kadilk glede na nekadilke posledica opisanega mehanizma.

Najbližje statistični pomembnosti so bili rezultati 3. sklopa ($p=0,059$), sledili so mu rezultati 1. sklopa ($p=0,104$), najdlje od statistične pomembnosti pa so rezultati 2. sklopa ($p=0,647$).

Upoštevanje starosti je pri vseh sklopih statistično pomembnost izboljšalo, kar kaže na pomembnost upoštevanja oziroma izključitve doprinosa starostnega skrajševanja telomer pri testiranju povezanosti kajenja z DT. Glede na rezultate vseh treh sklopov lahko rečemo, da je nakazana povezanost kajenja s krajšo DT znotraj našega vzorca pomenopavznih žensk, vendar ta povezanost ni statistično pomembna (p vseh $>0,05$). Do tovrstnega sklepa so prišli tudi pri vseh drugih raziskavah za katere smo našli, da so testirale povezanost kajenja in DT v vzorcu pomenopavznih žensk. Čeprav so v teh raziskavah primerjali le dolžine med kadilci in nekadilci, njihovi rezultati pa so skladni z našimi rezultati 1. sklopa (39, 47) lahko na podlagi njihovih in naših izsledkov sklepamo, da je znotraj vzorca pomenopavznih žensk možno zaznati zelo šibko krajšo DT pri nekadilkah glede na kadilke, ki pa ni statistično pomembna.

Končni rezultati vseh sklopov niso presenetljivi, kljub temu, da večina ne izkazuje statistično pomembne povezave med DT in statusom kajenja in posledično ne podpirajo opisanega potencialnega vpliva kajenja na telomere. Nepresenetljivi zato, ker so tudi rezultati drugih študij, ki so testirali tovrstno povezanost na enak način, a pri celotni populaciji žensk (ne le pomenopavznih), zelo mešani (poročajo statistično pomembno povezanost ali te povezanosti ne poročajo) (62) tako za 1.sklop (96–97), 2.sklop (93, 96, 98, 99) in 3. sklop (93, 96, 98, 99). Čeprav od vsakega od testiranih sklopov v okviru naše raziskave lahko najdemo po rezultatih skladne že objavljene raziskave, rezultati, razen 3.sklopa, niso skladni z rezultati največjih do sedaj narejenih metaanaliz (62). Te nakazujejo na šibek negativni trend statistično pomembne povezanosti med kajenjem in DT z zelo visoko nehomogenostjo. Tako lahko našo raziskavo štejemo med še eno raziskavo, ki viša tovrstno nehomogenost. Vzroki za nehomogenost med našo in ostalimi raziskavami, kot tudi za nehomogenost med ostalimi raziskavami 1., 2. in 3. Sklopa, so lahko različne karakteristike preučevanih populacij, različne velikosti vzorcev, upoštevanje različnega števila kovariat (starost, rasa, spol, ki lahko vplivajo na to povezanost), različne metode merjenja DT, različni biološki vzorci za merjenje DT, možnost, da DTL ne odseva stanja v drugih tkivih, pridobivanje podatkov preko subjektivnega samoocenjevanja in upoštevanje/neupoštevanje podatka o trajanju, načinu in intenziteti kajenja. Na splošno pa je pri preučevanju te povezanosti potrebno upoštevati tudi vpliv ocenjevanja povezanosti v določenem življenjskem obdobju, saj se povezanost zmanjšuje z leti predvsem pri moških zaradi fenomena zdravega kadilca. Ta fenomen opisuje opažanja, da posamezniki, ki doživijo akutne ali kronične dogodke (lahko tudi posledica kajenja), prej odnehajo kaditi. Prenehanje kajenja, zaradi slabega zdravja, je posebno povezano z moškimi, ki so bolj dovzetni za

kronične dogodke, in za starejše osebe, ki so pod večjim tveganjem za obolenost kot mlajši. Te tako prej prenehajo kaditi, zaradi česar lahko pride do podcenitve efekta kajenja na DT v starejšem obdobju. Poleg fenomena zdravega kadilca je potrebno upoštevati tudi razlike v kajenju med spoloma (imajo različne motivacije in uspešnost za prenehanje kajenja-ženske manjkrat prenehajo kaditi zaradi zdravja in so manj uspešne pri prenehanju kajenja) in vpliv sekundarnega kajenja (76, 79).

4.3.5 Povezanost dolžine telomer v levkocitih s fizično aktivnostjo

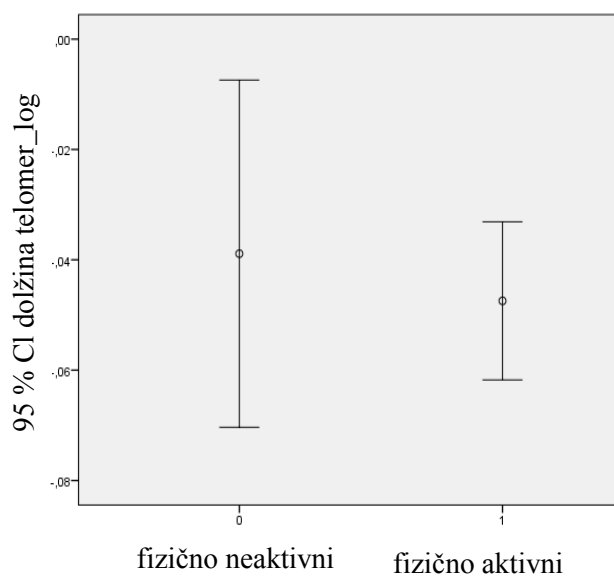
Fizična aktivnost je zadnji testirani dejavnik načina življenja v okviru naše raziskave, ki dokazano zmanjšuje stres in debelost, preventivno vpliva na razvoj kroničnih bolezni in dobro vpliva na splošno počutje ljudi. Preko zmanjševanja vnetja, oksidativnega stresa, preprečevanja zmanjšanja števila satelitnih celic in pozitivnega vpliva na aktivnost telomeraze ima fizična aktivnost potencial, da varuje tudi telomere pred njihovim skrajševanjem. Preučevanje pozitivnega vpliva športa, tudi preko raziskav povezave med fizično aktivnostjo in DT, je pomembno za razumevanje njegovega preventivnega učinka pri mlajših, kot tudi za razumevanje njegovega vpliva na staranje in za zagotavljanje čim kvalitetnejšega življenja starejših v prihodnosti. Da bi ocenili potencialno vpletenost fizične aktivnosti v varovanje telomer pred njihovim skrajševanjem, smo najprej preiskovanke ločili v 2 skupini. V skupino fizično aktivnih smo uvrstili vse preiskovanke, ki so se gibale ne glede na vrsto gibanja več kot 2,5 ure na teden, v skupino fizično neaktivnih pa tiste, ki so se gibale manj. Mejo 2,5 ure na teden smo izbrali glede na priporočila SZO za fizično aktivnost, starejših od 65 let. Nato smo preko seštevka števila ur aktivnosti na teden ne glede na vrsto fizične aktivnosti testirali tudi, kako njena intenziteta vpliva na DT. Na koncu smo pogledali še, kako posamezen tip aktivnosti vpliva na DT. Pri določanju skupin in števila ur aktivnosti smo imeli kar nekaj težav, saj so bili nekateri izvorni podatki tudi v obliki intervalov ali le opisni (tudi v obliki da/ne). Tako smo pri določevanju skupnega števila ur pri podatkih v obliki intervalov uporabili povprečje, opisnih podatkov pa nismo mogli upoštevati. Pri tistih, pri katerih smo glede na pisni podatek lahko določili skupino, smo to naredili, ostalih v analizo nismo vključili. Za testiranje smo izbrali 5 testov: Spearmanov test, t-test, ANCOVO, hi-kvadrat test in preizkus domneve o enakosti več aritmetičnih sredin več neodvisnih vzorcev (ANOVA).

Rezultati testov vpletenosti fizične aktivnosti v skrajševanje telomer so prikazani v Preglednicah 15 in 16 ter na pripadajočih Slikah 15 in 16. Pri testiranju med fizično aktivnimi

in neaktivnimi Spearmanov koeficient in razlika povprečij skupin (>0) kažeta, da je bila v povprečju DTL v skupini fizično aktivnih nekoliko krajša kot pri skupini neaktivnih, kar ni skladno s predvidevanjem o pozitivnem vplivu fizične aktivnosti na DT. Ker sta njuni vrednosti dokaj majhni, lahko rečemo, da omenjenega trenda ni, kar potrjujejo tudi rezultati testov ($p>0,05$), ki kažejo na statistično nepomembnost. To pomeni, da znotraj našega vzorca, na podlagi teh rezultatov, fizična aktivnost nima zaščitnega vpliva na DT. Po upoštevanju vpliva starosti na skrajševanje telomer se je statistična povezanost pričakovano povečala, a ne dovolj, da bi dosegla prag značilnosti. Takšen rezultat je delno lahko posledica uporabe samoocenjevalnih vprašalnikov za pridobitev podatkov o fizični aktivnosti in težko določevanje skupine pri preiskovankah, pri katerih je bil podan opisni podatek. Tako so zaradi zgornjih vzrokov v skupini fizično neaktivni lahko tudi nekatere preiskovanke, ki bi spadale med fizično aktivne.

Preglednica 15: Rezultati povezanosti DTL med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni.

		Fizično aktivni	Fizično neaktivni
		N	181
Povprečje		0,919	0,947
SD		0,204	0,259
Razlika v povprečju		$\beta=0,028$	
Spearmanova korelacija		$\rho=0,025$ $p=0,704$	
t-test za neodvisne vzorce		$t=0,541$ $p=0,589$	
ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	$F=1,225$ $p=0,296$	
	Vpliv starosti	$F=2,190$ $p=0,140$	
	Sprememba povezave po upoštevanju starosti	$F=0,330$ $p=0,566$	



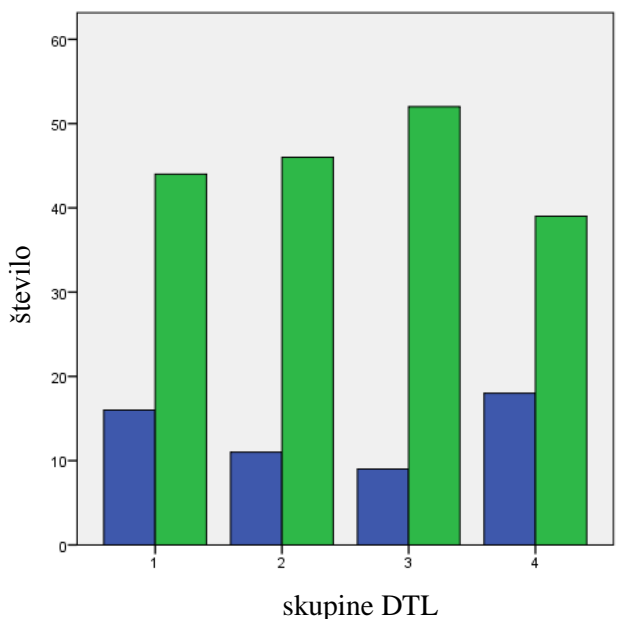
Slika 15: Prikaz rezultata t-testa med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni.

Da bi znotraj skupine fizično aktivnih morda zaznali vsaj razliko v frekventnosti med najkrajšimi in najdaljšimi telomerami smo izvedli test hi-kvadrat. Rezultat testa (Preglednica 15) nam pove, tako kot drugi testi, da ni statistično pomembnega vpliva fizične aktivnosti na

DT. Zanimiva pa je Slika 16, ki kaže, da se število fizično aktivnih iz skupine v skupino do zadnje skupine najdaljših telomer postopoma povečuje, kar je skladno z našo željo.

Preglednica 16: Rezultati hi-kvadrat testa med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni.

	Fizično aktivni	Fizično neaktivni
1=najkrajše telomere	44 (24,3%)	16 (29,6%)
2	46	11
3	52	9
4=najdaljše telomer	39 (21,5%)	18 (33,3%)
Skupaj	181	54
Hi-kvadrat test	$\chi^2=5,611$ $p=0,132$	



Slika 16: Prikaz razporeditve posameznih skupin DTL med skupinama fizično aktivni in fizično neaktivni: zelena fizično aktivni, modra fizično neaktivni.

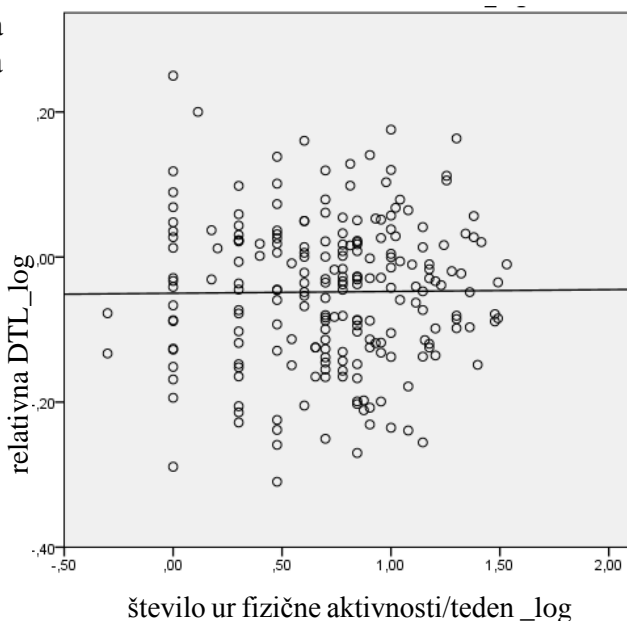
Rezultati testiranja vpliva intenzitete fizične aktivnosti na DTL so prikazani v Preglednici 17 in Sliki 17. Če bi pogledali le predznaka Spearmanovega koeficienta korelacije in naklona linearne premice (>0), bi lahko rekli, da je nakazana željena pozitivna korelacija med fizično aktivnostjo in DTL. Po pregledu njihovih vrednosti (skoraj nič) pa vidimo, da te korelacije ni, kar potrjujeta tudi visoki p-vrednosti ($>0,8$). Tako tudi intenziteta fizične aktivnosti nima vpliva na DT oziroma preko nje nismo našli statistično pomembne povezave med fizično aktivnostjo in DT.

Nazadnje smo pogledali še, če se povezava med intenziteto in DTL spreminja glede na tip aktivnosti (hoja, tek, kolesarjenje, plavanje, druga aktivnost). Rezultati s pripadajočimi slikami in razporeditev v skupine različne intenzitete so prikazani v preglednicah in slikah v Prilogi D. Pri vseh tipih aktivnosti se statistična pomembnost povezave med intenzivnostjo aktivnosti in DTL, kljub upoštevanju starosti, ne spremeni. Poleg tega je med skupinami intenzivnosti enega tipa aktivnosti različno nakazan trend, velikokrat tudi negativen. Takšni

rezultati so lahko posledica različnega števila preiskovank, ki so prakticirale določeno aktivnost, oziroma različnega števila predstavnic med posameznimi intenzivnostmi.

Preglednica 17: Rezultati testiranja vpliva intenzitete fizične aktivnosti na DTL.

	Relativna dolžina telomer	Št. ur fizične aktivnosti/ teden
N	218	218
Povprečje	0,919	7,7
SD	0,214	6,656
Mediana	0,917	6
Q1	0,757	3
Q3	1,051	10
Min	0,490	0,5
Max	1,779	34
Spearmanova korelacija	ρ	0,012
	p	0,861
Linearna regresija	b1	0,003
	b0	-0,050
	R2	0,000
	p	0,884



Slika 17: Prikaz linearnosti povezave relativne DTL s številom ur fizične aktivnosti/teden.

Na podlagi vseh podanih rezultatov lahko rečemo, da kljub ponekod nakazanemu pozitivnem vplivu fizične aktivnosti, ki je daleč od statistične pomembnosti, povezave med fizično aktivnostjo in DT znotraj našega vzorca pomenopavznih žensk ni. Naša ugotovitev je skladna (46, 100) in hkrati nasprotujoča (50, 84, 101) ugotovitvam drugih raziskav na vzorcih pomenopavznih žensk. Raziskave se razlikujejo glede na število preiskovank (44-1476), metodo merjenja DT (TRF, qPCR), raso (belke, belke in črnke), načinu pridobivanja podatka o fizični aktivnosti (samoocenjevalni vprašalnik, akcelerator), različnem načinu testiranja povezave (intervencije, primerjanje skupin različne intenzivnosti, primerjava med aktivnimi in neaktivnimi) in upoštevanje različnih kovariat. Rezultati so skladni tudi z večino raziskav izvedenih na starejši populaciji, saj so rezultati tudi tega dejavnika načina življenja zelo mešani (85–87). Večina tako kot mi te povezave ni našla, medtem ko so drugi našli ali pozitivno ali U povezavo (63, 83). V raziskavah, ki so imele možnost narediti tudi raziskavo povezanosti znotraj posameznega tipa fizične aktivnosti, tega niso naredili zaradi premajhnega števila preiskovancev posameznega tipa aktivnosti ali zaradi njihove neenakomerne razporejenosti v skupine pozameznih intenzitet znotraj enega tipa aktivnosti (85, 100). Najbolj raziskana od vseh tipov aktivnosti je hoja (85).

Rezultati vseh treh preizkušenih dejavnikov načina življenja znotraj naše raziskave (debelost, kajenje, fizična aktivnost) niso potrdili njihove povezanosti z DT, kljub velikokrat nakazanem željenem trendu. Razlog za to je verjetno zelo majhen vpliv posameznega dejavnika na DT, ki jo še posebej težko zaznamo v starejši populaciji, kjer je skrajševanje dokaj konstantno (25 do 45 bp/leto) in v primerjavi s skrajševanjem pred 20. letom majhno (12). To ugotovitev, poleg rezultatov študij posameznega dejavnika preko rezultatov blizu signifikantni pomembnosti ali šibki signifikantni povezanosti, nakazujejo tudi raziskave, ki so preučevale skupni efekt vseh dejavnikov na DT. Te raziskave nakazujejo, da upoštevanje vsakega dodatnega dejavnika zdravega načina življenja poveča statistično pomembnost povezanosti načina življenja z DT (57). Tako izgleda, da ima zdrav način življenja skupaj z vsemi sestavljajočimi dejavniki večji vpliv na DT, in da bi bilo v prihodnosti bolj smotrno še naprej raziskovati dejavnike zdravega življenja v populaciji pred 20. letom ali pa namesto presečnih raziskav raje izvajati longitudinalne raziskave, ki bi spremljale ta vpliv v več časovnih točkah preko celega življenja človeka (12). Morda bomo na podlagi takšnih raziskav v prihodnosti dobili še več vpogleda v pomembnost zdravega načina življenja od rojstva dalje in ugotovili, kateri dejavnik zdravega življenja ima največji vpliv na skrajševanje telomer oziroma razvoj kroničnih bolezni. Zaradi dejstva, da umrljivost zaradi kroničnih bolezni ne pada sorazmerno z napredkom v njihovem zdravljenju, bodo ta odkritja lahko zelo pomembna za večje zavedanje pomembnosti informiranja populacije in tudi zdravstvenega osebja o preventivnem in kurativnem učinku zdravega načina življenja (56, 102).

5 SKLEP

Namen magistrske naloge je bil proučiti povezanost dolžine telomer v levkocitih s staranjem in nekaterimi dejavniki načina življenja v skupini slovenskih pomenopavznih žensk. Za testiranje naše hipoteze o povezanosti smo delo razdelili v tri sklope. Prva dva sklopa, izolacija DNA in merjenje dolžine telomer z metodo qPCR, smo uspešno izvedli in zagotovili ustrezne podatke o dolžini telomer za nadaljnjo izvedbo tretjega sklopa, ki je vključeval statistično obdelavo podatkov. Raziskava ni prinesla pričakovanih rezultatov, torej potrditve naše hipoteze. Tako nismo dokazali povezanosti DTL s kronološko starostjo ($p=0,077$), starostjo ob menopavzi ($p=0,699$), leti mene ($p=0,349$), indeksom telesne mase ($p=0,799$), obsegom pasu ($p=0,634$), statusom kajenja: zdaj nekadilci/zdaj kadilci ($p=0,104$), nikoli kadilci/kadarkoli kadilci ($p=0,647$) in zdaj kadilci/nekdanji kadilci ($p=0,059$), fizično aktivnostjo/neaktivnostjo ($0,566$), urami fizične aktivnosti na teden ($p=0,884$) in z urami hoje ($p=0,054$) /tekom ($p=0,741$) /kolesarjenjem ($p=0,688$) /plavanjem ($p=0,415$) /drugim na teden ($p=0,959$). Kljub temu je večina rezultatov kazala na pričakovane trende. Na negativni trend pri povezovanju s kronološko starostjo, leti mene, ITM, obsegom pasu in statusom kajenja, ter pozitivni pri fizični aktivnosti. Mejno statistično značilne rezultate smo dosegli pri povezovanju s kronološko starostjo, pri zdaj kadilci/nekdanji kadilci in urami hoje na teden.

Na osnovi naših rezultatov težko potegnemo dokončne zaključke o povezanosti dolžine telomer s preučevanimi parametri. Rezultati naše raziskave so v skladu z drugimi študijami, ki prav tako nakazujejo določene povezave, toda ne dosežejo statistične pomembnosti. Od vseh izbranih dejavnikov je najbližje statistični povezanosti prišla kronološka starost, ki je tudi v že izvedenih študijah kazala od izbranih dejavnikov največ konsistentnih rezultatov statistične povezanosti.

Sklepamo, da obstajajo trije glavni razlogi za takšne rezultate. Prvi, da nismo upoštevali vseh dejavnikov, ki lahko vplivajo na dolžino telomer in imajo posamezno zelo majhen vpliv, zaradi česar jih je težko zaznati. Drugi, da smo testirali preozko starostno skupino žensk, kar je slabo vplivalo na statistično značilnost rezultatov in tretji, da smo del podatkov pridobili s samoocenjevanjem, kar lahko vodi v lažne rezultate. Kljub našim rezultatom, ki nakazujejo, da neka povezanost obstaja, vendar pa tega ne moremo trditi s statistično značilnostjo, je tovrstna raziskovalna naloga dobra podlaga za nadaljnje raziskave.

6 LITERATURA

1. Campbell Brown GS: Changes in telomere length in rabbit Osteoblasts following distraction osteogenesis. Abstract of thesis, The university of Edinburgh, 2015.
2. Luzar B, Gale N, Poljak M, Cör, A: Telomere in telomeraza pri človeku - zgradba, funkcija in vloga v procesu kancerogeneze. *Medicinski razgledi* 2000; 39: 271–9.
3. Luzar B, Poljak M, Klopčič U, Gale N: Pomen telomeraz pri staranju organizma in razvoju malignih tumorjev. *Onkologija* 2003; 7: 58-62.
4. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M: Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res* 2013; 319: 133-41.
5. Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS J* 2013; 280: 3180-93.
6. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Soreide K: Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg* 2016; 103: e29-46.
7. Eisenberg DT: Inconsistent inheritance of telomere length (TL): is offspring TL more strongly correlated with maternal or paternal TL? *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 8-9.
8. Sanders JL, Newman AB: Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol Rev* 2013; 35: 112-31.
9. Andrews NP, Fujii H, Goronzy JJ, Weyand CM: Telomeres and immunological diseases of aging. *Gerontology* 2010; 56: 390-403.
10. Reichert S, Stier A: Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. *Biol Lett* 2017; 13.
11. Zhang J, Rane G, Dai X, Shanmugam MK, Arfuso F, Samy RP, et al: Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res Rev* 2016; 25: 55-69.
12. Benetos A, Kark JD, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, et al: Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging cell* 2013; 12: 615-21.
13. Muezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H: A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev* 2013; 12: 509-19.
14. Dlouha D, Maluskova J, Kralova Lesna I, Lanska V, Hubacek JA: Comparison of the relative telomere length measured in leukocytes and eleven different human tissues. *Physiol. Res* 2014; 63: 343-50.
15. Gerbi SA: Beginning at the end: DNA replication within the telomere. *J Cell Biol* 2015; 210: 177-9.
16. Wellinger RJ: In the end, what's the problem? *Mol Cell* 2014; 53: 855-6.

17. Lin J, Kroenke CH, Epel E, Kenna HA, Wolkowitz OM, Blackburn E, et al: Greater endogenous estrogen exposure is associated with longer telomeres in postmenopausal women at risk for cognitive decline. *Brain Res* 2011; 1379: 224-31.
18. Černe JZ, Pohar-Perme M, Cerkovnik P, Geršak K, Novakovič S: Functional variants in CYP1B1, KRAS and MTHFR genes are associated with shorter telomere length in postmenopausal women. *Mech Ageing Dev* 2015; 149: 1-7. .
19. Muzumdar R, Atzmon G: Telomere length and aging. *Reviews on Selected Topics od Telomere Biology*. InTech 2012.
20. Blasco MA: Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 640-9.
21. Xi H, Li C, Ren F, Zhang H, Zhang L: Telomere, aging and age-related diseases. *Aging Clin Exp Res* 2013; 25: 139-46.
22. Nussey DH, Baird D, Barrett E, Boner W, Fairlie J, Gemmell N, et al: Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods Ecol Evol* 2014; 5: 299-310.
23. Valdes AM, Richards JB, Gardner JP, Swaminathan R, Kimura M, Xiaobin L, et al: Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2007; 18: 1203-10.
24. Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, Christensen H: Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66: 202-13.
25. Nersisyan L: Integration of Telomere Length Dynamics into Systems Biology Framework: A Review. *Gene Regul Syst Bio* 2016; 10: 35-42.
26. Cawthon RM: Telomere measurment by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e47.
27. Cawthon RM: Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e21.
28. Osler M, Bendix L, Rask L, Rod NH: Stressful life events and leucocyte telomere length: Do lifestyle factors, somatic and mental health, or low grade inflammation mediate this relationship? Results from a cohort of Danish men born in 1953. *Brain Behav Immun* 2016; 58: 248-53.
29. Gray KE, Schiff MA, Fitzpatrick AL, Kimura M, Aviv A, Starr JR: Leukocyte telomere length and age at manopause. *Epidemiology* 2014; 25: 139-46.
30. Cassidy A, De Vivo I, Liu Y, Han J, Prescott J, Hunter DJ, et al: Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 1273-80.
31. Takač I, Geršak K: Ginekologija in perinatologija. Medicinska fakulteta, Maribor, 2016.
32. Chow Erika T, Mahalingaiah S: Cosmetics use and age at menopause: is there a connection?. *Fertility and sterility* 2016; 106: 978-990.

33. El Khoudary SR: Gaps, limitations and new insights on endogenous estrogen and follicle stimulating hormone as related to risk of cardiovascular disease in women traversing the menopause: A narrative review. *Maturitas* 2017; 104: 44-53.
34. Dalgard C, Benetos A, Verhulst S, Labat C, Kark JD, Christensen K, et al: Leukocyte telomere length dynamics in women and men: menopause vs age effects. *Int J Epidemiol* 2015; 44: 1688-95.
35. Shenassa ED, Rossen LM: Telomere length and age-at-menopause in the US. *Maturitas* 2015; 82: 215-21.
36. Fagan E, Sun F, Bae H, Elo I, Andersen SL, Lee J, et al: Telomere length is longer in women with late maternal age. *Menopause* 2017; 24: 497-501.
37. Prescott J, Du M, Wong JY, Han J, De Vivo I: Paternal age at birth is associated with offspring leukocyte telomere length in the nurses' health study. *Hum Reprod* 2012; 27: 3622-31.
38. Lee DC, Im JA, Kim JH, Lee HR, Shim JY: Effect of long-term hormone therapy on telomere length in postmenopausal women. *Yonsei Medical Journal* 2005; 46: 471-9.
39. Kiefer A, Lin J, Blackburn E, Epel E: Dietary restraint and telomere length in pre- and postmenopausal women. *Psychosom Med* 2008; 70: 845-9.
40. Shin YA, Lee KY: Low estrogen levels and obesity are associated with shorter telomere lengths in pre- and postmenopausal women. *J Exerc Rehabil* 2016; 12: 238-46.
41. Tang NL, Woo J, Suen EW, Liao CD, Leung JC, Leung PC: The effect of telomere length, a marker of biological aging, on bone mineral density in elderly population. *Osteoporos Int* 2010; 21: 89-97.
42. Gruszecka A, Kopczyński P, Cudzilo D, Lipińska N, Romaniuk A, Barczak W, et al: Telomere shortening in Down syndrome patients--when does it start? *DNA Cell Biol* 2015; 34: 412-7.
43. You NY, Chen BH, Song Y, Lu X, Chen Y, Manson JE, et al: A prospective study of leukocyte telomere length and risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *Diabetes* 2012; 61: 2998-3004.
44. Qu S, Wen W, Shu XO, Chow WH, Xiang YB, Wu J, et al: Association of leukocyte telomere length with breast cancer risk: nested case-control findings from the Shanghai Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 2013; 177: 617-24.
45. De Vivo I, Prescott J, Wong JY, Kraft P, Hankinson SE, Hunter DJ: A prospective study of relative telomere length and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1152-6.
46. Mason C, Risques RA, Xiao L, Duggan CR, Imayama I, Campbell KL, et al: Independent and combined effects of dietary weight loss and exercise on leukocyte telomere length in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21: e549-54.

47. Dlouha D, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA: Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1222-5.
48. Carty CL, Kooperberg C, Liu J, Herndon M, Assimes T, Hou L, et al: Leukocyte Telomere Length and Risks of Incident Coronary Heart Disease and Mortality in a Racially Diverse Population of Postmenopausal Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 2225-31.
49. Raymond AR, Norton GR, Woodiwiss AJ, Brooksbank RL: Impact of Gender and Menopausal Status on Relationships Between Biological Aging, as Indexed by Telomere Length, and Aortic Stiffness. *American Journal of Hypertension* 2015; 28: 623-30.
50. Kim JH, Ko JH, Lee DC, Lim I, Bang H: Habitual physical exercise has beneficial effects on telomere length in postmenopausal women. *Menopause* 2012; 19: 1109-15.
51. Aydos SE, Elhan AH, Tukun A: Is telomere length one of the determinants of reproductive life span? *Arch Gynecol Obstet* 2005; 272: 113-6.
52. Butts S, Riethman H, Ratcliffe S, Shaunik A, Coutifaris C, Barnhart K: Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4835-43.
53. Prescott J, McGrath M, Lee IM, Buring JE, De Vivo I: Telomere length and genetic analyses in population-based studies of endometrial cancer risk. *Cancer* 2010; 116: 4275-82.
54. El Khoudary SR, Santoro N, Chen HY, Tepper PG, Brooks MM, Thurston RC, et al. Trajectories of estradiol and follicle-stimulating hormone over the menopause transition and early markers of atherosclerosis after menopause. *Eur J Prev Cardiol* 2016; 23: 649-703.
55. Tepper PG, Brooks MM, Randolph JF, Jr., Crawford SL, El Khoudary SR, Gold EB, et al. Characterizing the trajectories of vasomotor symptoms across the menopausal transition. *Menopause* 2016; 23: 1067-74.
56. Bodai BI, Nakata TE, Wong WT, Clark DR, Lawenda S, Tsou C, et al: Lifestyle Medicine: A Brief Review of Its Dramatic Impact on Health and Survival. *Perm J* 2017;22.
57. Sun Q, Shi L, Prescott J, Chiuve SE, Hu FB, De Vivo I, et al: Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One* 2012; 7: e38374.
58. Perez LM, Amaral MA, Mundstock E, Barbe-Tuana FM, Guma F, Jones MH, et al: Effects of Diet on Telomere Length: Systematic Review and Meta-Analysis. *Public Health Genomics* 2017; 20: 286-92.
59. Mathur MB, Epel E, Kind S, Desai M, Parks CG, Sandler DP, et al: Perceived stress and telomere length: A systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field. *Brain Behav Immun* 2016; 54: 158-69.
60. Oliveira BS, Zunzunegui MV, Quinlan J, Fahmi H, Tu MT, Guerra RO: Systematic review of the association between chronic social stress and telomere length: A life course perspective. *Ageing Res Rev* 2016; 26: 37-52.
61. Coimbra BM, Carvalho CM, Moretti PN, Mello MF, Belangero SI: Stress-related telomere length in children: A systematic review. *J Psychiatr Res* 2017; 92: 47-54.

62. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W, Network PR: Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res* 2017; 158: 480-9.
63. Mundstock E, Zatti H, Louzada FM, Oliveira SG, Guma FT, Paris MM, et al: Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 2015; 22: 72-80.
64. Mundstock E, Sarria EE, Zatti H, Mattos Louzada F, Kich Grun L, Herbert Jones M, et al: Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)* 2015; 23: 2165-74.
65. Kim S, Parks CG, DeRoo LA, Chen H, Taylor JA, Cawthon RM, et al: Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 816-20.
66. Chen S, Yeh F, Lin J, Matsuguchi T, Blackburn E, Lee ET, Howard BV, Zhao J: Short leukocyte telomere length is associated with obesity in Ameran Indians: The strong heart family study. *Aging* 2014; 6: 380-9.
67. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L: Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 10497-538.
68. Kaur J: A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014; 2014: 943162.
69. Zhou Y, Hambly BD, McLachlan CS: FTO associations with obesity and telomere length. *J Biomed Sci* 2017; 24: 65.
70. Nordfjall K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P, Roos G: Telomere length is associated with obesity parameters but with a gender difference. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 2682-9.
71. Zannolli R, Mohn A, Buoni S, Pietrobelli A, Messina M, Chiarelli F, et al: Telomere length and obesity. *Acta Paediatr* 2008; 97: 952-4.
72. Dankel SJ, Loenneke JP, Loprinzi PD: The impact of overweight/obesity duration and physical activity on telomere length: An application of the WATCH paradigm. *Obes Res Clin Pract* 2017; 11: 247-52.
73. Buss J, Havel PJ, Epel E, Lin J, Blackburn E, Daubenmier J: Associations of ghrelin with eating behaviors, stress, metabolic factors, and telomere length among overweight and obese women: preliminary evidence of attenuated ghrelin effects in obesity? . *Appetite*. 2014; 76: 84-94.
74. Garcia-Calzon S, Moleres A, Gomez-Martinez S, Diaz LE, Bueno G, Campoy C, et al: Association of telomere length with IL-6 levels during an obesity treatment in adolescents: interaction with the-174G/C polymorphism in the IL-6gene. *Pediatr Obes* 2017; 12: 157-63.
75. Chen X, Velez JC, Barbosa C, Pepper M, Andrade A, Stoner L, et al: Smoking and perceived stress in relation to short salivary telomere length among caregivers of children with disabilities. *Stress* 2015; 18: 20-8.

76. Wulaningsih W, Serrano FEC, Utarini A, Matsuguchi T, Watkins J: Smoking, second-hand smoke exposure and smoking cessation in relation to leukocyte telomere length and mortality. *Oncotarget* 2016; 7: 60419-31.
77. Verde Z, Reinoso-Barbero L, Chicharro L, Garatachea N, Resano P, Sanchez-Hernandez I, et al: Effects of cigarette smoking and nicotine metabolite ratio on leukocyte telomere length. *Environ Res* 2015; 140: 488-94.
78. Babizhayev MA, Yegorov YE: Smoking and health: association between telomere length and factors impacting on human disease, quality of life and life span in a large population-based cohort under the effect of smoking duration. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 425-42.
79. Zhang C, Lauderdale DS, Pierce BL: Sex-Specific and Time-Varying Associations Between Cigarette Smoking and Telomere Length Among Older Adults. *Am J Epidemiol* 2016; 184: 922-32.
80. Marcon F, Siniscalchi E, Andreoli C, Allione A, Fiorito G, Medda E, et al: Telomerase activity, telomere length and hTERT DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells from monozygotic twins with discordant smoking habits. *Environ Mol Mutagen* 2017; 58: 551-9.
81. Gao X, Mons U, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H: DNA methylation changes in response to active smoking exposure are associated with leukocyte telomere length among older adults. *Eur J Epidemiol* 2016; 31: 1231-41.
82. Latifovic L, Peacock SD, Massey TE, King WD: The Influence of Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Physical Activity on Leukocyte Telomere Length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; 25: 374-80.
83. Arsenis AN, You T, Ogawa EF, Tinsley GM, Zuo L: Physical activity and telomere length: impact of aging and potential mechanisms of action. *Oncotarget* 2017; 8: 45008-19.
84. Shadyab AH, LaMonte MJ, Kooperberg C, Reiner AP, Carty CL, Manini TM, et al: Leisure-time physical activity and leukocyte telomere length among older women. *Exp Gerontol* 2017; 95: 141-7.
85. Soares-Miranda L, Imamura F, Siscovick D, Jenny NS, Fitzpatrick AL, Mozaffarian D: Physical Activity, Physical Fitness, and Leukocyte Telomere Length: The Cardiovascular Health Study. *Med Sci Sports Exerc* 2015; 47: 2525-34.
86. Sassenroth D, Meyer A, Salewsky B, Kroh M, Norman K, Steinhagen-Thiessen E, et al: Sports and Exercise at Different Ages and Leukocyte Telomere Length in Later Life--Data from the Berlin Aging Study II (BASE-II). *PLoS One* 2015; 10: e0142131.
87. Silva LC, de Araujo AL, Fernandes JR, Matias Mde S, Silva PR, Duarte AJ, et al: Moderate and intense exercise lifestyles attenuate the effects of aging on telomere length and the survival and composition of T cell subpopulations. *Age (Dordr)* 2016; 38: 24.
88. FlexiGen® DNA Kit (Protocol: Isolation of DNA from 1-3 ml Whole Blood), 2015.
89. <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>, dostopno: junij 2018. .

90. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012.
91. Gil ME, Coetzer TL: Real-time quantitative PCR of telomere length. *Molecular Biotechnology* 2004; 27: 169-171.
92. Muezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H: Body mass index and leukocyte telomere length in adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2014; 15: 192-201.
93. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al: Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *The Lancet* 2005; 366: 662-4.
94. Cui Y, Gao YT, Cai Q, Qu S, Cai H, Li HL, et al: Associations of leukocyte telomere length with body anthropometric indices and weight change in Chinese women. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21: 2582-8.
95. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Langlois M, et al: Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell* 2007; 6: 639-47.
96. Muezzinler A, Mons U, Dieffenbach AK, Butterbach K, Saum KU, Schick M, et al: Smoking habits and leukocyte telomere length dynamics among older adults: Results from the ESTHER cohort. *Exp Gerontol* 2015; 70: 18-25.
97. Wang Y-Y, Chen A-F, Wang H-Z, Xie L-Y, Sui K-X, Zhang Q-Y: Association of shorter mean telomere length with large artery stiffness in patients with coronary heart disease. *The Aging Male* 2010; 14: 27-32.
98. Harris SE, Martin-Ruiz C, Von Zglinicki T, Starr JM, Deary IJ: Telomere length and aging biomarkers in 70-year-olds: the lothian birth cohort 1936. *Neurobiology of Aging* 2012; 33: 1486.e3-1486.e8.
99. Needham BL, Adler N, Gregorich S, Rehkopf D, Lin J, Blackburn EH, et al: Socioeconomic status, health behavior, and leukocyte telomere length in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2002. *Social Science & Medicine* 2013; 85: 1-8.
100. Du M, Prescott J, Kraft P, Han J, Giovannucci E, Hankinson SE, et al: Physical activity, sedentary behavior, and leukocyte telomere length in women. *Am J Epidemiol* 2012; 175: 414-22.
101. Shadyab AH, LaMonte MJ, Kooperberg C, Reiner AP, Carty CL, Manini TM, et al: Association of Accelerometer-Measured Physical Activity With Leukocyte Telomere Length Among Older Women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017; 72: 1532-7.
102. Diaz VA, Mainous AG, 3rd, Everett CJ, Schoepf UJ, Codd V, Samani NJ: Effect of healthy lifestyle behaviors on the association between leukocyte telomere length and coronary artery calcium. *Am J Cardiol* 2010; 106: 659-63.

7 PRILOGE

Priloga A: Koncentracije in čistosti vseh izoliranih vzorcev.

št. vzorca	c(izolirane DNA) [ng/ul]	A260/A280	A260/A230	št. vzorca	c(izolirane DNA) [ng/ul]	A260/A280	A260/A230
2971	69,555	1,801	2,097	3007	195,553	1,852	1,965
2972	47,028	1,848	2,257	3008	201,516	1,845	1,860
2973	215,149	1,848	1,726	3009	236,422	1,831	1,893
2974	113,707	1,844	1,652	3010	51,499	1,835	1,250
2975	185,510	1,846	1,946	3011	83,414	1,831	1,493
2976	75,223	1,844	1,492	3012	113,132	1,814	1,412
2977	82,214	1,853	1,356	3013	58,849	1,820	1,346
2978	97,164	1,852	1,668	3014	84,730	1,814	1,312
2979	292,736	1,863	2,087	3015	123,628	1,842	1,538
2980	103,462	1,877	1,766	3016	95,014	1,808	1,201
2981	163,523	1,841	1,939	3017	112,523	1,832	1,589
2982	145,391	1,867	1,877	3018	179,888	1,846	1,850
2983	101,264	1,891	1,692	3020	99,320	1,830	1,231
2984	137,220	1,839	1,797	3021	111,972	1,873	1,429
2985	98,588	1,870	1,656	3022	122,400	1,861	1,270
2986	115,886	1,869	1,755	3023	247,305	1,850	1,487
2987	34,950	1,845	1,120	3024	121,646	1,837	1,312
2988	148,850	1,841	1,604	3025	79,258	1,809	1,521
2989	143,880	1,824	1,516	3026	116,024	1,795	1,505
2990	94,758	1,819	1,160	3027	83,422	1,811	1,519
2991	72,460	1,808	1,294	3028	133,260	1,825	1,789
2992	80,909	1,800	1,247	3029	159,145	1,820	1,844
2993	67,530	1,833	1,558	3030	186,347	1,834	1,840
2994	123,534	1,883	1,657	3031	102,065	1,816	2,308
2995	102,917	1,822	1,554	3032	321,477	1,833	2,267
2996	79,547	1,822	1,611	3033	181,953	1,821	2,328
2997	105,069	1,828	1,463	3034	113,416	1,818	2,145
2998	138,972	1,822	1,497	3037	101,078	1,794	1,158
2999	93,735	1,860	1,336	3038	174,501	1,798	1,208
3000	53,613	1,852	1,585	3039	283,995	1,791	1,339
3001	160,449	1,845	1,885	3040	318,362	1,816	1,538
3002	244,388	1,689	1,835	3041B	137,270	1,792	1,085
3003	116,575	1,823	1,807	3042A	201,038	1,761	1,116
3004	82,555	1,850	1,726	3035	135,569	1,822	1,484
3005	169,733	1,838	1,971	3036	196,290	1,850	1,702
3006	105,581	1,834	1,762	3043	169,711	1,841	1,722

3044	156,972	1,862	1,753
3045	154,366	1,843	1,631
3046	291,051	1,846	1,897
3047	91,802	1,818	1,328
3048	202,444	1,850	1,848
3049	206,379	1,862	1,951
3050	145,209	1,859	1,810
3051	181,050	1,842	1,765
3052	214,252	1,857	1,803
3053	264,086	1,863	1,952
3054	359,164	1,854	1,960
3055	233,659	1,870	1,979
3056	269,908	1,863	2,027
3057	162,503	1,862	1,885
3058	144,800	1,854	1,864
3059	165,376	1,855	1,812
3060	213,194	1,831	1,693
3061	184,769	1,851	1,978
3062	302,187	1,862	2,075
3063	111,693	1,846	1,724
3064	116,859	1,846	1,679
3065	158,383	1,855	1,869
3066	190,378	1,858	2,069
2774	216,029	1,863	1,888
2779	251,315	1,876	1,875
2784	184,442	1,835	1,952
2797	154,776	1,874	1,219
2813	161,622	1,834	1,469
2817	114,994	1,824	1,400
2822	407,361	1,826	1,599
2828	151,539	1,841	1,445
2829	162,242	1,815	1,280
2831	300,298	1,843	1,624
2832	109,685	1,873	1,202
2840	217,034	1,833	1,465
2844	205,632	1,874	1,420
2845	137,938	1,892	1,233
2846	137,706	1,873	1,243
2847	219,926	1,840	1,631
2849	287,815	1,827	1,714
2854	174,934	1,824	1,683
2856	144,671	1,808	1,303
2857	172,379	1,794	1,548
2858	158,529	1,816	1,426

2860	219,730	1,834	1,843
2861	243,482	1,805	1,471
2865	135,592	1,874	1,409
2866	116,926	1,867	1,445
2867	135,285	1,813	1,367
2868	126,167	1,807	1,535
2869	215,345	1,819	1,534
2878	170,816	1,824	1,346
2879	151,225	1,798	1,350
2882	281,422	1,811	1,740
2883	181,004	1,754	1,349
2885	188,720	1,773	1,348
2888	219,950	1,832	1,650
2893	144,860	1,817	1,667
2894	211,294	1,794	1,507
2896	156,764	1,804	1,070
2897	197,865	1,807	1,381
2907	253,795	1,798	1,503
2914	290,610	1,833	1,633
2915	293,777	1,852	1,775
2760	261,300	1,880	2,130
2761	254,920	1,863	2,041
2762	282,500	1,880	1,870
2763	322,981	1,861	1,836
2764	256,300	1,910	1,830
2765	408,100	1,900	1,940
2767	187,500	1,870	1,890
2769	380,800	1,910	1,930
2770	533,830	1,824	1,814
2772	262,959	1,854	1,940
2773	255,212	1,859	2,027
2780	490,723	1,879	2,076
2781	541,500	1,860	1,730
2782	383,203	1,875	2,129
2785	330,800	1,880	1,970
2786	253,516	1,870	2,022
2787	308,900	1,910	1,820
2788	327,900	1,920	1,900
2790	282,013	1,832	1,924
2791	215,600	1,880	1,870
2792	271,193	1,845	1,980
2793	171,500	1,870	1,860
2794	184,900	1,870	1,790
2795	308,800	1,890	2,140

2800	274,800	1,780	1,510	2567	116,649	1,804	1,671
2804	194,400	1,890	1,840	2569	136,173	1,818	1,869
2806	291,100	1,910	1,630	2570	297,718	1,790	1,615
2808	189,500	1,840	1,210	2572	172,035	1,819	1,561
2809	182,600	1,910	2,340	2577	142,333	1,813	1,545
2818	102,300	1,930	1,290	2766	309,902	1,849	1,926
2507	245,058	1,875	1,397	2768	113,409	1,840	1,552
2789	133,072	1,875	1,233	2775	140,436	1,833	1,779
2799	118,921	1,857	0,936	2776	169,523	1,845	1,783
2811	194,750	1,855	1,333	2777	219,956	1,840	1,779
2815	154,222	1,851	1,312	2778	176,100	1,862	1,621
2827	137,397	1,896	1,014	2798	137,653	1,879	1,389
2833	177,813	1,863	1,373	2805	188,174	1,829	1,747
2835	173,065	1,896	1,333	2812	270,690	1,869	1,732
2836	138,955	1,890	0,899	2819	254,936	1,845	1,727
2837	164,260	1,893	1,112	2820	349,353	1,794	1,416
2848	113,342	1,845	1,321	2821	194,447	1,835	1,578
2863	156,618	1,802	1,118	2823	239,139	1,847	1,509
2864	160,891	1,823	1,256	2825	232,725	1,865	1,584
2873	141,218	1,816	1,650	2826	268,253	1,852	1,572
2880	127,246	1,855	1,285	2830	134,900	1,833	1,341
2884	117,050	1,794	1,484	2834	165,251	1,873	1,356
2889	195,630	1,847	1,538	2838	204,911	1,847	1,510
2905	214,939	1,809	1,337	2841	170,998	1,813	1,379
2916	174,634	1,862	1,330	2842	283,406	1,842	1,752
2921	76,299	1,838	1,570	2843	492,055	1,842	1,717
2922	101,323	1,810	1,568	2862	213,369	1,811	1,609
2456	130,937	1,854	1,082	2870	144,170	1,811	1,493
2459	156,715	1,815	1,733	2877	208,478	1,812	1,608
2469	234,749	1,806	1,514	2881	81,857	1,822	1,289
2475	128,072	1,811	1,726	2887	198,002	1,781	1,459
2488	103,610	1,798	1,609	2898	130,357	1,797	1,550
2496	147,351	1,831	1,729	2900	253,467	1,817	1,957
2499	173,588	1,820	1,748	2901	145,789	1,790	1,464
2501	129,568	1,852	1,001	2903	260,160	1,800	1,638
2514	237,929	1,808	1,599	2904	175,792	1,759	1,375
2543	236,578	1,832	1,760	2906	109,995	1,784	1,294
2547	193,366	1,829	1,702	2908	267,690	1,806	1,593
2548	289,427	1,831	1,765	2909	195,246	1,813	1,670
2550	114,776	1,814	1,627	2010	172,903	1,802	1,607
2558	247,586	1,824	1,656	2912	112,234	1,802	1,512
2560	213,907	1,802	1,913	2913	301,561	1,799	1,628
2566	294,000	1,830	1,851	2546B	299,700	1,870	1,790
2564	273,039	1,845	1,804	2551A	134,688	1,816	1,883

2561B	246,800	1,760	1,380
2562B	66,228	1,817	1,139
2807A	160,900	1,920	1,310
2810A	212,400	1,880	1,260
2814A	254,400	1,890	1,690
2824B	236,800	1,820	1,510
2839A	135,800	1,890	1,370
2871B	81,123	1,806	1,787
2874A	286,592	1,823	1,584
2875A	353,931	1,841	1,776
2876A	148,400	1,770	1,180
2886A	231,998	1,788	1,392
2899B	140,400	1,770	1,170
2911B	141,888	1,813	1,433
2917B	80,200	1,830	1,310
2472B	39,610	1,783	1,341
2509B	24,534	1,754	1,363
2530B	39,097	1,738	1,446
2544B	18,828	1,750	0,689
2568B	71,863	1,860	1,890
2783B	31,412	1,774	1,212
2872B	35,997	1,822	1,345
2890B	42,587	1,722	0,690
2895B	43,078	1,775	1,590
2918B	25,174	1,903	0,766
2919B	34,706	1,857	0,960
2920B	15,415	1,986	0,628
povp.	180,520	1,836	1,613
SD	88,256	0,036	0,273
min	15,415	1,689	0,628
max	541,500	1,986	2,340

Priloga B: Rezultati qPCR-Cq in relativna dolžina telomer posameznih vzorcev.

Številka serije	Številka vzorca	Povprečni Cq referenčnega gena	Povprečni Cq tarčnega gena	Relativna dolžina telomer
SERIJA 1	kalibrator	27,41	12,71	/
	2499	27,38	12,64	1,028
	2501	27,68	12,24	1,585
	2507	27,44	12,92	0,900
	2509	27,20	12,62	0,921
	2514	27,24	12,69	0,907
	2530	27,16	12,30	1,089
	2543	27,34	12,85	0,878
	2544	28,35	13,09	1,447
	2546	27,28	12,69	0,931
	2547	27,35	12,56	1,054
	2548	27,25	12,69	0,917
	2550	27,29	12,51	1,049
	2551	27,21	12,57	0,952
	2558	27,49	12,87	0,961
	2560	27,18	12,56	0,939
	2561	27,47	13,10	0,819
	2562	27,34	13,16	0,716
	2564	27,23	12,85	0,820
	2566	27,16	12,56	0,933
	2567	27,27	12,85	0,836
	2568	27,10	12,42	0,976
	2569	26,93	12,40	0,884
	2570	27,24	12,75	0,874
2572	27,33	12,60	1,020	
SERIJA 2	kalibrator	27,19	12,64	/
	2577	27,31	12,61	1,100
	2760	27,20	12,64	1,010
	2761	27,26	12,55	1,104
	2762	27,17	12,76	0,923
	2763	27,21	12,26	1,273
	2764	27,35	12,62	1,124
	2765	27,20	12,66	1,001
	2766	27,49	12,00	1,779
	2767	27,27	12,95	0,882
SERIJA 2	2768	27,41	12,82	1,043
	2769	27,29	12,53	1,144
	2770	27,12	12,56	1,004
	2771	27,24	12,70	1,003
	2772	27,17	12,47	1,092
	2773	27,17	12,60	1,016
	2774	27,30	12,68	1,055
	2775	27,32	12,11	1,493
	2776	27,47	12,57	1,254
	2777	27,46	13,48	0,729
	2778	27,18	12,81	0,901
	2779	27,20	12,42	1,153
	2780	27,18	12,67	0,977
	2781	27,27	12,76	0,986
	2782	27,19	12,71	0,963
	2783	27,38	12,59	1,169
	2784	27,10	12,62	0,957
	2785	27,49	12,75	1,139
	2786	27,48	12,33	1,457
	2787	27,50	12,55	1,294
	2788	27,49	12,83	1,092
	2789	27,49	12,65	1,217
	2790	27,14	12,31	1,179
	2791	27,43	12,44	1,319
2792	27,21	12,80	0,926	
2793	27,40	12,91	0,979	
2794	27,39	12,69	1,105	
SERIJA 3	kalibrator	27,19	12,65	/
	2795	27,08	12,20	1,201
	2796	27,19	12,56	1,049
	2797	27,23	12,58	1,067
	2798	27,31	12,46	1,200
	2799	27,26	13,09	0,808
	2800	27,07	12,61	0,938
2801	27,09	12,42	1,064	

SERIJA 3	2802	27,12	12,47	1,056
	2803	27,12	12,76	0,895
	2804	27,29	12,70	1,032
	2805	27,03	12,65	0,895
	2806	27,21	12,71	0,977
	2807	27,48	12,68	1,183
	2808	27,30	12,85	0,956
	2809	27,35	12,97	0,922
	2810	27,25	12,61	1,061
	2811	27,29	12,98	0,882
	2812	27,11	12,52	1,019
	2813	27,03	12,60	0,919
	2814	27,09	12,29	1,148
	2815	27,31	12,78	0,996
	2816	27,12	12,88	0,830
	2817	27,27	12,55	1,120
	2818	27,28	12,67	1,042
	2819	27,12	12,53	1,014
	2820	26,96	12,29	1,051
	2821	27,06	12,07	1,268
	2822	26,84	12,64	0,789
	2823	27,20	12,56	1,056
	2824	27,17	12,55	1,039
	2825	27,32	12,59	1,121
	2826	27,18	12,56	1,038
	2827	27,52	12,46	1,375
	2828	27,21	12,73	0,962
	2829	27,20	12,27	1,254
	2830	26,98	12,78	0,800
	SERIJA 4	kalibrator	27,52	12,43
2831		27,25	12,29	0,911
2832		27,47	12,76	0,797
2833		27,33	12,39	0,902
2834		27,41	12,95	0,683
2835		27,44	12,68	0,815
2836		27,70	12,90	0,845
2837		27,66	13,07	0,750
2838		27,32	12,72	0,736
2839		27,34	12,54	0,830
2840		27,13	12,44	0,770
2841		27,26	12,72	0,709
2842		26,87	12,60	0,592
2843		27,23	12,44	0,827
2844		27,41	12,77	0,760

SERIJA 4	2845	27,45	12,87	0,737	
	2846	27,29	12,76	0,709	
	2847	27,10	12,99	0,543	
	2848	27,23	12,57	0,762	
	2849	27,25	12,15	0,992	
	2854	27,12	12,49	0,747	
	2855	27,48	12,93	0,723	
	2856	27,11	12,78	0,624	
	2857	27,19	12,71	0,684	
	2858	26,94	12,68	0,588	
	2859	27,56	12,89	0,779	
	2860	27,33	12,53	0,832	
	2861	27,28	12,65	0,750	
	2862	27,19	12,56	0,746	
	2863	27,42	12,85	0,732	
	2864	27,32	12,79	0,706	
	2865	27,46	12,76	0,786	
	2866	27,15	12,63	0,699	
	2867	27,36	12,44	0,897	
	2868	27,44	12,73	0,790	
	2869	27,25	12,88	0,640	
	2870	27,33	12,71	0,750	
	SERIJA 5	kalibrator	27,27	12,76	/
		2871	26,93	12,17	1,146
		2872	27,13	11,90	1,506
		2873	27,16	12,67	0,985
		2874	27,12	12,54	1,041
		2875	27,16	12,24	1,262
2876		27,53	12,55	1,318	
2877		27,25	12,79	0,973	
2878		27,15	12,42	1,137	
2879		27,17	12,23	1,275	
2880		27,36	12,97	0,931	
2881		27,58	12,73	1,229	
2882		27,01	12,55	0,963	
2883		27,46	12,70	1,160	
2884		27,17	12,65	1,001	
2885		27,16	12,75	0,940	
2886		27,26	12,63	1,075	
2887		27,18	12,55	1,075	
2888		27,18	12,56	1,065	
2889		27,24	12,72	1,004	
2890		28,17	13,76	0,936	
2891	27,23	12,38	1,213		

SERIJA 5	2892	27,19	12,63	1,025
	2893	27,05	12,67	0,926
	2894	27,00	12,25	1,141
	2895	27,27	12,94	0,902
	2896	27,06	12,50	1,030
	2897	27,15	12,50	1,085
	2898	27,18	12,11	1,383
	2899	27,43	12,68	1,153
	2900	27,01	12,61	0,936
	2901	27,05	12,27	1,160
	2902	27,24	12,76	0,986
	2903	27,02	12,96	0,768
	2904	27,22	12,85	0,927
	2905	27,36	12,38	1,313
	2906	27,30	12,85	0,967
	SERIJA 6	kalibrator	27,32	12,07
2907		27,53	12,92	0,697
2908		27,04	12,60	0,611
2909		26,80	11,46	1,000
2910		27,06	12,59	0,620
2911		27,18	12,86	0,577
2912		26,96	12,89	0,490
2913		27,17	12,50	0,705
2914		27,23	12,78	0,624
2915		27,33	13,09	0,555
2916		27,39	12,72	0,718
2917		27,25	13,02	0,551
2918		28,12	13,49	0,710
2919		27,78	13,04	0,761
2920		28,57	13,83	0,747
2921		27,16	12,27	0,798
2922		26,99	12,64	0,578
3035		27,22	12,62	0,681
3036		27,33	12,31	0,873
3037		27,48	12,64	0,794
3038		27,27	12,95	0,582
3039		27,46	13,06	0,615
3040		27,38	12,79	0,684
3041		27,42	12,79	0,700
3042	27,43	12,84	0,685	
3043	27,50	12,64	0,805	
3044	27,57	12,59	0,864	
3045	27,58	12,99	0,691	
3046	27,49	13,07	0,626	

SERIJA 6	3047	27,55	12,55	0,872
	3048	27,42	12,76	0,712
	3049	27,41	12,71	0,728
	3050	27,54	12,72	0,786
	3051	27,46	13,04	0,623
	3052	27,48	12,91	0,678
	3053	27,42	12,68	0,745
	3054	27,28	12,83	0,627
	3055	27,32	13,14	0,537
	3056	27,30	12,67	0,697
	3057	27,42	12,61	0,776
	3058	27,47	12,68	0,769
	3059	27,37	13,27	0,514
	3060	27,36	13,11	0,562
SERIJA 7	kalibrator	27,58	12,32	/
	3061	27,45	12,90	0,663
	3062	27,51	12,77	0,740
	3063	27,67	12,77	0,818
	3064	27,71	12,79	0,829
	3065	27,68	12,86	0,781
	3066	27,58	13,33	0,561
	2971	27,25	12,87	0,596
	2972	27,33	12,36	0,834
	2973	27,59	13,13	0,634
	2974	27,60	13,14	0,632
	2975	27,59	12,79	0,771
	2976	27,65	12,74	0,821
	2977	27,76	13,02	0,751
	2978	27,78	13,09	0,729
	2979	27,64	12,89	0,751
	2980	27,68	12,73	0,845
	2981	27,59	12,67	0,823
	2982	27,60	12,88	0,738
	2983	27,80	12,83	0,855
	2984	27,70	12,72	0,857
	2985	27,87	12,98	0,819
	2986	27,83	12,90	0,837
	2987	27,91	13,23	0,727
2988	27,66	12,76	0,818	
2989	27,68	12,57	0,920	
2990	27,80	12,97	0,790	
2991	27,83	12,84	0,865	
2992	27,71	12,94	0,759	
2993	27,75	13,01	0,748	

SERIJA 7	2994	27,86	13,20	0,719
	2995	27,73	12,59	0,935
	2996	27,73	12,64	0,915
	2997	27,75	12,86	0,817
	2998	27,78	12,93	0,795
	2999	27,78	13,05	0,743
	3000	27,87	13,23	0,712
	3001	27,45	12,51	0,825
	3002	27,43	12,64	0,761
	3003	27,70	12,62	0,910
	3004	27,59	12,66	0,830
	3005	27,52	13,05	0,632
	3006	27,63	12,74	0,816
	SERIJA 8	kalibrator	27,65	12,89
3007		27,59	12,55	1,172
3008		27,57	12,77	1,014
3009		27,46	12,61	1,043
3010		27,89	13,09	1,032
3011		27,76	13,09	0,949
3012		27,63	12,72	1,078
3013		27,77	12,48	1,353
3014		27,88	13,25	0,935
3015		27,77	12,94	1,049
3016		27,82	12,84	1,134
3017		27,76	12,89	1,065
3018		27,58	12,69	1,069
3020		28,11	13,26	1,073

SERIJA 8	3021	28,14	12,89	1,344
	3022	28,43	13,51	1,139
	3023	28,07	13,25	1,051
	3024	28,15	13,33	1,062
	3025	27,67	12,94	0,981
	3026	27,68	12,56	1,228
	3027	27,88	12,65	1,316
	3028	27,78	12,32	1,499
	3029	27,76	12,80	1,121
	3030	27,70	12,96	0,986
	3031	27,47	12,95	0,858
	3032	27,45	12,48	1,117
	3033	27,46	12,88	0,895
	3034	27,58	12,67	1,077
	3037	27,75	13,03	0,979
	3038	27,66	12,86	1,013
	3039	27,45	12,90	0,877
	3040	27,55	12,91	0,925
	3041	27,89	13,15	0,996
	3042	27,77	12,86	1,092
	2456	27,82	12,82	1,151
	2459	27,60	12,80	1,019
	2469	27,67	12,82	1,053
	2472	27,38	12,74	0,917
	2475	27,53	12,54	1,130
	2488	27,29	12,35	1,088
	2496	27,45	12,46	1,126

Priloga C: Rezultati Shapiro-Willk testa normalne porazdelitve izbranih podatkov. Sivo so obarvani normalno porazdeljeni podatki

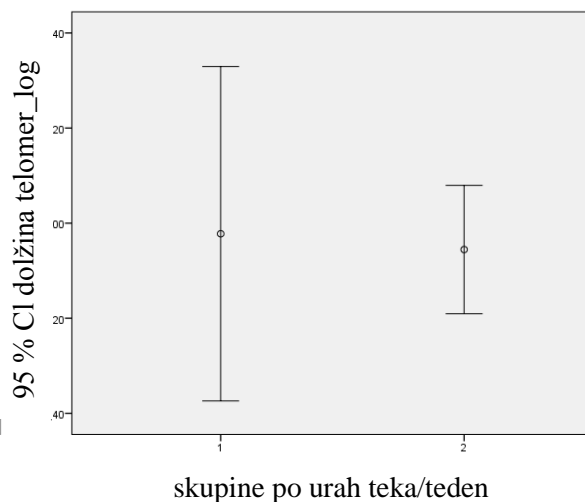
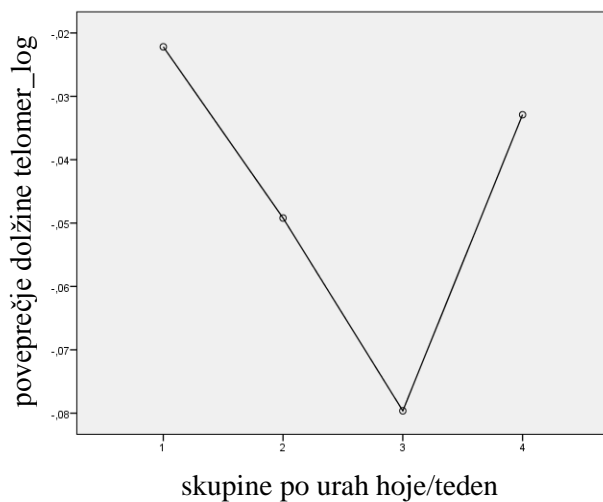
	N	Skewness	Kurtosis	z	p
Dolžina telomer	275	-0,068	-0,247	-0,463/-0,843	0,550
Starost	275	-0,296	-0,842	-2,014/-2,874	0,000
Starost od menopavze do odvzema vzorca	261	-1,298	1,297	-8,596/4,323	0,000
Starost ob menopavzi	262	-0,662	0,295	-4,413/0,983	0,000
ITM	275	0,314	-0,180	2,136/-0,614	0,081
Obseg pasu	265	0,109	-0,378	0,727/-1,268	0,182
Št. ur aktivnosti/teden	218	-0,300	-0,435	-1,818/-1,326	0,001
Zdaj kadilci	30	-0,283	-0,702	-0,663/-0,843	0,423
Zdaj nekadilci	240	-0,041	-0,193	-0,261/-0,617	0,841
Kadarkoli kadilci	50	-0,328	-0,539	-0,973/-0,814	0,154
Nikoli kadilci	219	0,003	-0,145	0,018/-0,443	0,795
Bivši kadilci	20	-0,486	0,006	-0,949/0,006	0,386
Fizično aktivni	181	-0,215	-0,294	-1,188/-0,263	0,305
Fizično neaktivni	54	0,141	-0,168	0,434/-0,263	0,879
Hoja 1. skupina	63	-0,057	0,417	-0,189/0,701	0,834
Hoja 2. skupina	73	-0,326	-0,384	-1,160/-0,692	0,410
Hoja 3. skupina	33	-0,087	-0,414	-0,213/-0,519	0,777
Hoja 4. skupina	49	-0,001	-0,056	-0,003/-0,084	0,953
Tek 1. skupina	3	1,696	-0,056	1,384/-1,152	0,129
Tek 2. skupina	5	0,327	1,490	0,358/0,745	0,846
Kolesarjenje 1. skupina	31	-0,417	0,050	-0,991/0,061	0,592
Kolesarjenje 2. skupina	23	-0,349	-0,776	-0,726/-0,830	0,294
Kolesarjenje 3. skupina	10	0,478	-0,318	0,696/-0,238	0,886
Plavanje 1. skupina	18	-0,852	1,400	1,590/1,349	0,291
Plavanje 2. skupina	13	0,103	-1,015	0,167/0,852	0,606
Druga fizična aktivnost 1. skupina	31	0,047	0,034	0,112/0,041	0,896
Druga fizična aktivnost 2. skupina	20	-0,637	-0,509	1,244/0,513	0,134
Druga fizična aktivnost 3. skupina	4	1,565	2,283	1,543/0,872	0,195
Druga fizična aktivnost 4. skupina	5	-0,303	-1,194	0,332/0,597	0,359

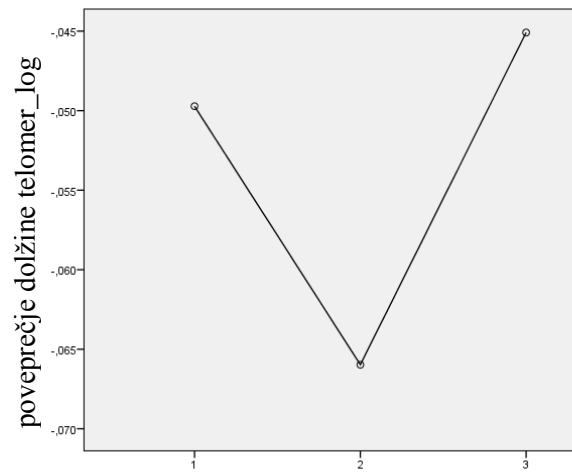
Priloga D: Rezultati povezanosti dolžine telomer v levkocitih z različnimi tipi fizične aktivnosti s pripadajočimi slikami in razporeditev v skupine različnih intenzitet.

Logaritmsko transformirana relativna dolžina telomer	Št. ur hoja/teden				
		1.skupina	2.skupina	3.skupina	4.skupina
	N	63	73	33	49
	Povprečje	0,976	0,919	0,8506	0,949
	SD	0,233	0,262	0,179	0,208
	Mediana	0,963	0,917	0,823	0,935
	Spearmanova korelacija	$\rho=-0,091$ $p=0,179$			
	ANOVA	$F=2,629$ $p=0,051$ med 1 in 3 skupino $p=0,041$			
	ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	Vpliv starosti		Sprememba povezave po upoštevanju starosti
		$F=2,304$ $p=0,060$	$F=1,256$ $p=0,264$	$F=2,587$ $p=0,054$	
	Št. ur tek/teden				
		1.skupina	2.skupina		
	N	3	5		
	Povprečje	0,986	0,903		
	SD	0,344	0,232		
	Mediana	0,805	0,873		
	Spearmanova korelacija	$\rho=0,056$ $p=0,895$			
	t-test	$t=-0,377$ $p=0,719$			
	ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	Vpliv starosti		Sprememba povezave po upoštevanju starosti
		$F=0,060$ $p=0,943$	$F=0,006$ $p=0,943$	$F=0,122$ $p=0,741$	
	Št. ur kolesarjenje/teden				
		1.skupina	2.skupina	3.skupina	
	N	31	23	10	
	Povprečje	0,911	0,872	0,908	
	SD	0,185	0,151	0,120	
	Mediana	0,917	0,923	0,903	
	Spearmanova korelacija	$\rho=-0,058$ $p=0,647$			
	ANOVA	$F=0,343$ $p=0,711$			
	ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	Vpliv starosti		Sprememba povezave po upoštevanju starosti
		$F=0,254$ $p=0,858$	$F=0,099$ $p=0,755$	$F=0,376$ $p=0,688$	
Št. ur plavanje/teden					
	1.skupina	2.skupina			
N	18	13			
Povprečje	1,035	0,970			
SD	0,176	0,190			
Mediana	1,012	0,977			
Spearmanova korelacija	$\rho=-0,207$ $p=0,263$				
t-test	$t=1,005$ $p=0,323$				

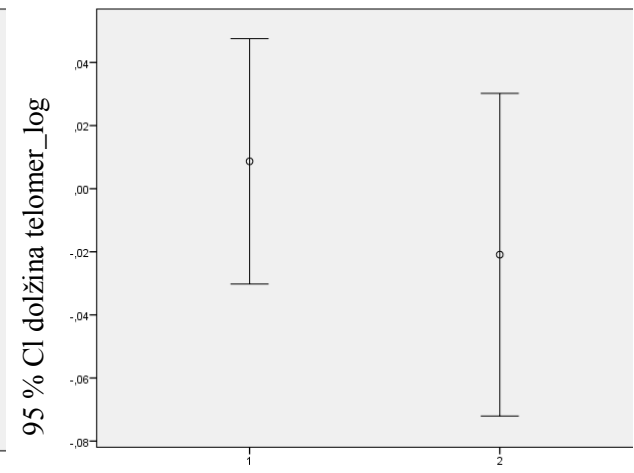
ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	Vpliv starosti		Sprememba povezave po upoštevanju starosti
	F=1,519 p=0,232	F=2,801 p=0,106		F=0,909 p=0,415
Št. ur drugo/teden				
	1.skupina	2.skupina	3.skupina	4.skupina
N	31	20	4	5
Povprečje	0,965	0,980	1,003	0,988
SD	0,2222	0,236	0,182	0,174
Mediana	0,931	0,956	0,936	0,926
Spearmanova korelacija	ρ=0,086 p=0,515			
ANOVA	F=0,085 p=0,986			
ANCOVA	Homogenost regresijskih naklonov	Vpliv starosti		Sprememba povezave po upoštevanju starosti
	F=0,197 p=0,939	F=0,531 p=0,469		F=0,102 p=0,959

	Hoja [ure/teden]	Tek [ure/teden]	Kolesarjenje [ure/teden]	Plavanje [ure/teden]	Drugo [ure/teden]
1 skupina	< 2,5	< 2	> 2,5	≤1,5	> 2
2 skupina	2,5 - 5	≥ 2	3 - 7	>1,5	2 - 4
3 skupina	5 - 7,5		> 7		4 - 7
4 skupina	>7,5				> 7

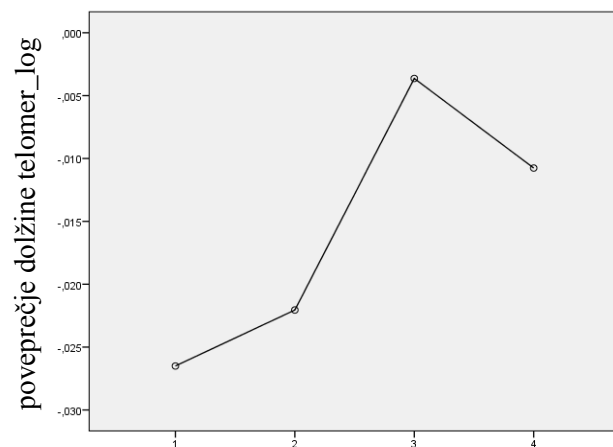




skupine po urah kolesarjenja/teden



skupine po urah plavanja/teden



skupine po urah drugo/teden