

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NADJA PIPAN
DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NADJA PIPAN

DIPLOMSKA NALOGA

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV A-795G IN G12496A V GENU ZA
TIOREDOKSIN S KONCENTRACIJAMI Hg²⁺ IN MeHg PRI
MATERAH IN NOVOROJENČKIH**

**ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS A-795G AND
G12496A OF THE THIOREDOXIN GENE AND CONCENTRATIONS
OF Hg²⁺ AND MeHg IN MOTHERS AND NEWBORNS**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Vzorci krvi, urina in las nosečnic ter popkovnične krvi so bili odvzeti v Sloveniji (Porodnišnica Ljubljana, UKC Ljubljana) in na Hrvaškem (Klinički bolniški center, Klinika za ginekologijo in porodništvo, Reka) v sklopu raziskav evropskega projekta PHIME FP6 (Public Health Impact of long-term, low-level Mixed Element Exposure in susceptible population strata). Meritve koncentracij toksičnih kovin so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Zahvala

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici asist. dr. Simoni Jurković Mlakar, mag. farm. za vso strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za prijazno pomoč pri delu v laboratoriju.

Velika zahvala gre moji družini za spodbujanje in podporo ter prijateljem za nepozabna leta tekom celotnega študija.

Izjava

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

Ljubljana, 2012

Nadja Pipan

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Kerec-Kos, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-----|
| OPOMBA AVTORJA..... | ii |
| POVZETEK | iii |
| ABSTRACT | v |
| SEZNAM OKRAJŠAV | vii |
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 Živo srebro in njegova toksičnost..... | 1 |
| 1.2 Globalno kroženje in ekotoksikologija živega srebra..... | 2 |
| 1.3 Toksikokinetika živega srebra | 2 |
| 1.4 Mehanizmi toksičnega delovanja živega srebra in toksikodinamika | 4 |
| 1.5 Oksidativni stres in vpliv toksičnih kovin na organizem nosečnice in razvoj zarodka | |
| 1.5.1 Tioredoksinski in glutationski antioksidantni sistem | 9 |
| 1.5.2 Tioredoksin..... | 10 |
| 2. NAMEN DELA | 14 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 15 |
| 3.1 Preiskovana populacija..... | 15 |
| 3.2 Določanje koncentracije Hg ²⁺ in MeHg | 15 |
| 3.3 Določanje koncentracije ostalih kovin, arzena, selena in PUFA..... | 16 |
| 3.4 Izolacija DNK..... | 16 |
| 3.5 Alelna diskriminacija z uporabo TaqMan [®] sond..... | 17 |
| 3.5.1 Priprava vzorcev za qPCR reakcijo | 18 |
| 3.5.2 Potek qPCR reakcije..... | 20 |
| 3.6 Statistične metode..... | 21 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA | 22 |
| 4.1 Rezultati alelna diskriminacije | 22 |
| 4.1.1 Težave, s katerimi smo se srečali pri alelni diskriminaciji..... | 26 |
| 4.2 Pregled značilnosti preiskovane populacije..... | 27 |
| 4.3 Obdelava rezultatov s statističnimi testi | 30 |
| 4.3.1 Testiranje povezanosti polimorfizma 12496C>T s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v laseh, krvi, urinu in mleku hrvaških mater ter popkovnični krvi | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1.1 Vključitev kovariat pri testiranju povezanosti polimorfizma 12496C>T s koncentracijami Hg ²⁺ v laseh in krvi hrvaških mater ter popkovnični krvi | 33 |
| 4.3.1.2 Ocena razporeditve Hg ²⁺ med materino in popkovnično krvjo glede na genotip polimorfizma 12496C>T pri hrvaških materah | 33 |
| 4.3.2 Testiranje povezanosti polimorfizma -795A>G s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v laseh, krvi, urinu in mleku hrvaških mater ter popkovnični krvi | 34 |
| 4.3.3 Testiranje povezanosti kombinacije genotipov polimorfizmov 12496C>T in -795A>G pri hrvaških materah s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v laseh, krvi in mleku hrvaških mater ter popkovnični krvi..... | 35 |
| 4.3.4 Testiranje povezanosti preučevanih polimorfizmov pri hrvaških otrocih s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v popkovnični krvi ter s koncentracijami Hg ²⁺ v urinu otrok..... | 35 |
| 4.3.5 Testiranje povezanosti kombinacije genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka (po parih) s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v popkovnični krvi | 36 |
| 4.3.6 Testiranje povezanosti kombinacije genotipov polimorfizma -795A>G matere in otroka (po parih) s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v popkovnični krvi | 38 |
| 4.3.7 Testiranje povezanosti genotipov preučevanih polimorfizmov pri slovenskih otrocih s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v popkovnični krvi | 40 |
| 4.3.8 Testiranje povezanosti preučevanih polimorfizmov pri združeni populaciji slovenskih in hrvaških otrok s koncentracijami Hg ²⁺ in MeHg v popkovnični krvi... | 41 |
| 5. SKLEP | 42 |
| 6. LITERATURA | 44 |
| 7. PRILOGE | 48 |

OPOMBA AVTORJA

V diplomskem delu za poimenovanje polimorfizmov uporabljamo drugačno poimenovanje, kakor ga navaja naslov. Upoštevali smo smernice poimenovanja polimorfizmov iz članka *Nomenclature for the description of human sequence variations* avtorjev Dunnen J T in Antorakis E (*Hum Genet*, 109, 2001: 121-124). Tako tudi zaradi večje preglednosti govorimo o polimorfizimih **-795A>G** (in ne A795G) ter o **12496C>T** (in ne G12496A; pri tem polimorfizmu smo ločevali med aleloma C in T in ne med G in A, ki sta na komplementarni verigi).

POVZETEK

POVEZANOST POLIMORFIZMOV A-795G IN G12496A V GENU ZA TIOREDOKSIN S KONCENTRACIJAMI Hg²⁺ IN MeHg PRI MATERAH IN NOVOROJENČKIH

Izpostavljenost živemu srebru (Hg²⁺) in metilživemu srebru (MeHg) je pri nosečnicah posebej problematična, saj prenos obeh omenjenih oblik Hg po popkovnični krvi povzroči nevrološke razvojne nepravilnosti zarodka. Vezava Hg²⁺ in MeHg na tiolne (-SH) skupine proteinov in celičnih encimov, ki sodelujejo v antioksidantni zaščiti organizma, zniža obrambno sposobnost organizma pred škodljivimi učinki reaktivnih kisikovih ali dušikovih zvrsti (ROS, RNS). Eden od antioksidantnih sistemov, ki deluje na podlagi molekul, bogatih z -SH skupinami, je tudi tioredoksinski sistem.

V diplomskem delu smo preučili povezanost enonukleotidnih polimorfizmov (SNP) v genu, ki kodira protein tioredoksin (TRX) s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v krvi, popkovnični krvi, laseh, urinu in mleku preiskovane populacije nosečnic in novorojenčkov. Želeli smo ugotoviti morebiten vpliv posameznega polimorfizma na nivo Hg²⁺ in MeHg. Spremembe v genu *TRX* bi lahko spremenile metabolizem omenjenih oblik Hg v organizmu ali pa drugačno zvižanje proteina, ki se mu lahko posledično spremeni redoks aktivnost. V raziskavo smo vključili 213 hrvaških nosečnic in 179 njihovih novorojenčkov ter 431 slovenskih novorojenčkov. Po izolaciji DNK iz materine venske krvi in popkovničnega tkiva novorojenčka smo z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času in z uporabo alelnih specifičnih sond pri vsakem preiskovancu določili genotip polimorfizmov -795A>G in 12496C>T v genu *TRX*. S statistično obdelavo smo ovrednotili značilne povezave posameznih genotipov ali kombinacij obeh genotipov s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v vzorcih, najprej ločeno za populacijo mater, slovenskih in hrvaških otrok, nato po hrvaških parih mati-otrok ter na koncu še za vse otroke skupaj.

Ugotovili smo, da je materin polimorfizem 12496C>T mejno značilno povezan s koncentracijami Hg²⁺ v materini krvi (p=0,100) ter laseh (p=0,076), značilno pa s koncentracijami Hg²⁺ v popkovnični krvi (p=0,032), pri čemer so v vseh treh primerih koncentracije Hg²⁺ najvišje pri preiskovankah z genotipom TT, ne glede na genotip otroka. Vpliv genotipa smo potrdili z izključitvijo vplivov različnih kovariat, kot so koncentracije drugih toksičnih kovin, selena, arzena, in starost matere. Vse omenjene kovariate lahko

vplivajo na oksidoredukcijski status v organizmu ter na obrambno sposobnost matere pred škodljivimi učinki po izpostavljenosti Hg^{2+} in MeHg.

Pri polimorfizmu -795A>G nismo odkrili statistično značilne povezanosti s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg pri posameznih populacijah, pač pa v kombinaciji genotipov hrvaške matere in otroka v povezavi s koncentracijo Hg^{2+} v popkovnični krvi ($p=0,057$). Povezanost se je izkazala za še bolj značilno, ko smo izključili vpliv kovariat. Najvišje koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi so bile pri preiskovankah z genotipom AG, ne glede na genotip otroka.

Za slovensko populacijo nismo dobili statistično značilnih povezav med genotipom otroka in koncentracijami Hg^{2+} /MeHg v popkovnični krvi. Potrebno bi bilo preveriti še povezavo z genotipi slovenskih mater. Prav tako bi raziskavo nadalje nadgradili z večjim številom vzorcev s podatki o koncentracijah MeHg v bioloških vzorcih. Tako bi dobili boljše rezultate z večjo statistično močjo. Iz rezultatov lahko zaključimo, da genotip matere bolj vpliva na koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi, kakor genotip otroka, ter da sta rizična faktorja za večjo izpostavljenost ploda živemu srebru genotipa 12496TT ter -795AG v genu *TRX* pri materi.

ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS A-795G AND G12496A OF THE THIOREDOXIN GENE AND CONCENTRATIONS OF Hg²⁺ AND MeHg IN MOTHERS AND NEWBORNS

Exposure to mercury (Hg²⁺) and methyl mercury (MeHg) is particularly problematic in the group of pregnant women, because both of the mentioned chemical entities are transferred through the cord blood and thus they can cause neurological developmental disorders of the fetus. Binding of Hg²⁺ and MeHg to thiol (-SH) groups of proteins and cellular enzymes, which are involved in the antioxidant protection of the organism, amplifies the harmful effects of reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS). One of the antioxidant systems which include molecules, reacting by -SH groups, is thioredoxin (TRX) system.

Within the scope of our research we estimated the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *TRX* gene with concentrations of Hg²⁺ and MeHg in blood, cord blood, hair, urine and milk samples, obtained from the chosen population of mothers and newborns. Our goal was to check, whether any of two polymorphisms effect the level of Hg²⁺ and MeHg. Changes in the *TRX* gene could possibly change the metabolism of Hg²⁺ and MeHg in the human organism or cause different folding of the protein, thus changing its redox activity. For that purpose, 213 pregnant women and their 179 newborns from Croatia were recruited in the study and another 431 newborns from Slovenia. After the DNA isolation process from the mothers' venous blood and cord tissues, we determined the genotypes of the analyzed polymorphisms -795A>G and 12496C>T for each individual using the method of real time-polymerase chain reaction and the allele specific assays. Using the statistical software we looked for the significant associations between each genotype alone or the combinations of both with the Hg²⁺ and MeHg concentrations in the samples. We analyzed Croatian mothers, Croatian children and Slovenian children separately first, secondly we analyzed Croatian mother-child pairs and finally the whole population of children together.

Our findings indicate there exists marginally significant association between mothers' polymorphism 12496C>T and the concentrations of Hg²⁺ in maternal blood (p=0,100) and

hair ($p=0,076$) and significant association with concentrations of Hg^{2+} in cord blood ($p=0,032$). In all three cases we observed the highest mean value of the Hg^{2+} concentrations in the group of mothers with the TT genotype, regardless the newborn's genotype. The effect of the genotype was confirmed excluding the effect of covariates, e.g. concentrations of other heavy metals, of Se, As and the effect of mother's age. All mentioned covariates effect the redox state of the organism and they involve into protective mechanisms that help mothers fight against the harmful effects after exposure to Hg^{2+} and MeHg.

We found no significant association between polymorphism -795A>G and Hg^{2+} /MeHg concentrations for a single population, but we found the association between the combination of Croatian mother's and newborn's genotype and the concentration of Hg^{2+} in the cord blood ($p=0,057$). The association was found even more significant after having excluded the effects of covariates. The highest concentrations of Hg^{2+} in the cord blood were observed in the group of mothers with the AG genotype, regardless the genotype of the newborn.

Analyzing the population of Slovenian newborns we found no significant associations between the newborn's genotype and the concentrations of Hg^{2+} /MeHg in the cord blood. It would be necessary to check the association with the Slovenian mothers' genotype as well. Moreover, we could upgrade the future research with more data of MeHg concentrations, thus improving the statistical power of the tests. Based on our findings we can conclude that mother's genotype has a stronger impact on the Hg^{2+} concentrations in the cord blood than the genotype of the fetus and that the risk factors for the higher exposure of fetus to Hg^{2+} are mother's genotypes 12496TT and -795AG in the *TRX* gene.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|--------------------------------|--|
| 3'-UTR | 3' - nekodirajoča regija (angl. <i>3' - untranslated region</i>) |
| AAS | atomska absorpcijska spektroskopija |
| AK | aminokislina |
| ANCOVA | analiza kovarianc |
| ANOVA | analiza varianc |
| ASK 1 | regulatorna kinaza apoptoznega signala 1 (angl. <i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>) |
| buHg | koncentracija živega srebra v urinu novorojenčkov (angl. <i>baby urine Hg</i>) |
| c | koncentracija (angl. <i>concentration</i>) |
| CAT | katalaza |
| cord MeHg | koncentracija metilživega srebra v popkovnični krvi |
| cordHg | koncentracija živega srebra v popkovnični krvi |
| cordSe | koncentracija selena v popkovnični krvi |
| CŽS | centralni živčni sistem |
| dNTP | deoksiribonukleotidtrifosfat |
| FAD | flavin adenin dinukleotid |
| GC-ECD | plinska kromatografija z detektorjem na zajetje elektronov (angl. <i>gas chromatography - electron capture detector</i>) |
| GC-FID | plinska kromatografija s plamensko ionizacijskim detektorjem (angl. <i>gas chromatography - flame ionisation detector</i>) |
| GFR | hitrost glomerulne filtracije (angl. <i>glomerular filtration rate</i>) |
| GPX | glutation peroksidaza |
| GR | glutation reduktaza |
| GRX | glutaredoksin |
| GSH | glutation |
| HEB | hematoencefalna bariera |
| HG-AFS | hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (angl. <i>Hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i>) |
| hHg | koncentracija živega srebra v lasih nosečnic (angl. <i>hair Hg</i>) |
| HIF1α | s hipoksijo inducirani faktor 1 α |

| | |
|---------------|--|
| hMeHg | koncentracija metilživega srebra v lasih nosečnic (angl. <i>hair MeHg</i>) |
| HWE | Hardy-Weinbergova enačba |
| ICP MS | masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (angl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>) |
| ITM | indeks telesne mase |
| JNK | N-terminalna kinaza c-Jun |
| MANOVA | multivariatna analiza varianc |
| MAPK | z mitogenom aktivirane protein kinaze |
| mHg | koncentracija živega srebra v krvi nosečnic (angl. <i>maternal Hg</i>) |
| milkHg | koncentracija živega srebra v mleku doječih mater |
| milkSe | koncentracija selena v mleku doječih mater |
| mMeHg | koncentracija metilživega srebra v krvi nosečnic (angl. <i>maternal MeHg</i>) |
| mSe | koncentracija selena v krvi nosečnic (angl. <i>maternal Se</i>) |
| MTs | metalotioneini |
| muHg | koncentracija anorganskega živega srebra v urinu nosečnic (angl. <i>maternal urine Hg</i>) |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NFκB | jedrni faktor kappa B (angl. <i>nuclear factor kappa B</i>) |
| PI3K | fosfoinozitol-3-kinaza |
| PUFA | večkrat nenasičene maščobne kisline (angl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>) |
| qPCR | verižna reakcija s polimerazo v realnem času oz. kvantitativni PCR (angl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>) |
| RNS | reaktivne dušikove spojine (angl. <i>reactive nitrogen species</i>) |
| ROS | reaktivne kisikove spojine (angl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| SD | standardna deviacija |
| SNP | enonukleotidni polimorfizem (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>) |
| SOD | superoksidna dismutaza |
| TRX | tioeredoksin |
| TrxR | tioeredoksin reduktaza |
| VEGF | žilni endotelijski rastni faktor (angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>) |

1. UVOD

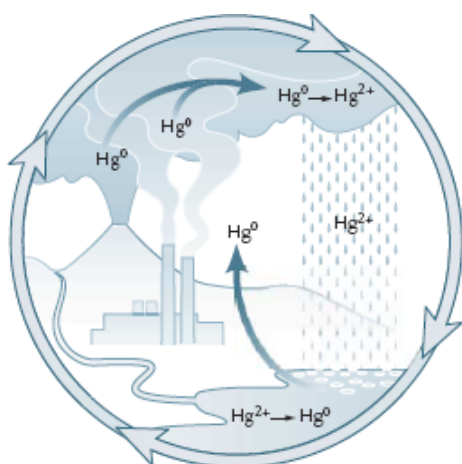
1.1 Živo srebro in njegova toksičnost

Živo srebro je edina kovina, ki je pri standardni temperaturi in tlaku v tekočem agregatnem stanju. V naravi se pojavlja v rudnih depozitih večinoma kot cinabarit (živosrebrov sulfid). Uporablja se za polnjenje termometrov, barometrov, sfigmomanometrov, plavajočih ventilov in v nekaterih električnih stikalih, varčnih sijalkah ter drugih aparatih. Zaradi toksičnosti in nevarnosti za okolje se namesto Hg vse bolj uporabljajo alkohol, polprevodni elementi ter zlitine galija, indija in kositra (galinstani). Tudi v medicini se uporaba opušča in je dandanes omejena na amalgamske zalivke, ki vsebujejo elementno živo srebro, tiomersal (organska živosrebrova spojina, ki se uporablja kot konzervans v cepivih), merbromin (topikalni antiseptik pri manjših odrgninah in urezninah) in nekatere diuretike, laksative, pršila za nos ter mazila proti pleničnemu izpuščaju. (1)

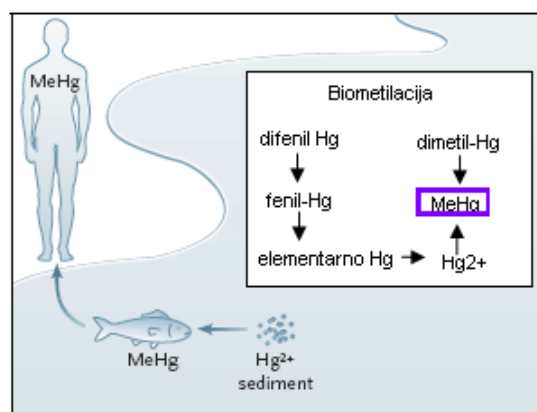
Glede varnosti uporabe tiomersala kot konzervansa v cepivih so mnenja deljena. Longitudinalna študija, opravljena v Veliki Britaniji, je pokazala, da zgodnja izpostavljenost tiomersalu v okviru predvidenih imunizacijskih shem nima evidentnega učinka na nevrološki ali fiziološki izid pri razvoju otroka. Razlog je lahko v etilživosrebrovem fragmentu molekule, ki se v primerjavi z MeHg hitreje metabolizira in izloči iz telesa. (2) Rezultati podobne študije iz ZDA pa so pokazali, da obstaja direktna povezanost med zvišanimi koncentracijami Hg^{2+} zaradi tiomersal vsebujočih cepiv in med nevrološko razvojno motnjo, imenovano avtizem. (3) Zato je bil leta 2007 v ZDA tiomersal umaknjen iz večine cepiv, ki jih uporabljajo v otroški imunizacijski shemi. (4) Najbolj znan primer zastrupitve z živosrebrovimi spojinami je ekološka katastrofa iz petdesetih let prejšnjega stoletja v Minamati na Japonskem, kjer je prišlo do široko razširjenega pojava zastrupitev z organskimi Hg-spojinami zaradi prehranjevanja z morskimi živalmi, izpostavljenimi industrijskim odplakam z vsebujočim metilživim srebrom (MeHg). Odmevnejša zastrupitev iz enakih razlogov je sledila še v Niigati na Japonskem, v Iraku pa se je zastrupilo veliko število ljudi zaradi uporabe MeHg in EtHg kot fungicidov v kmetijstvu in posledični prisotnosti omenjenih spojin v žitih in rižu. (5, 6)

1.2 Globalno kroženje in ekotoksikologija živega srebra

Atmosfersko živo srebro je v obliki živosrebrnih par (Hg^0). Njegov izvor predstavljajo odplinjevanje iz zemeljske skorje, vulkanski izbruhi ter izhlapevanje iz oceanov in tal. Signifikantni prispevek predstavljajo tudi antropogeni viri, kot so rudniki in talilnice živega srebra, izgorevanje premoga, sežigalnice in kloroalkalna industrija. Hg^0 je kemijsko stabilen plin, ki se v atmosferi zadržuje približno eno leto, dokler se ne reducira v vodotopno anorgansko obliko Hg^{2+} , v kateri se z dežjem vrača na zemeljska tla. Sledi povratek v atmosfero v obliki par po predhodni redukciji, lahko pa pride do metilacije, ki jo vršijo mikroorganizmi v sedimentih sladke in morske vode. Pri tem nastaja MeHg, ki vstopi v prehranjevalno verigo vodnih živali in preko njih v prehrano ljudi. (8) Shematski prikaz globalnega kroženja in reakcij biometilacije prikazujeta sliki 1 in 2.



Slika 1: Kroženje Hg v naravi (8)



Slika 2: Reakcije biometilacije. (8)

Difenil Hg se uporablja kot reagent v kemični industriji ter kot pesticid.

1.3 Toksikokinetika živega srebra

Živo srebro se v okolju pojavlja v treh različnih oblikah, in sicer:

- pare živega srebra (Hg^0),
- anorgansko živo srebro v obliki Hg^+ ali Hg^{2+} soli, npr. s klorom, žveplom, kisikom,
- organske živosrebrove spojine (vezava ionske oblike elementa na enega ali dva ogljikova atoma). (6)

V preglednici I so pregledno predstavljene razlike v toksikokinetičnih lastnostih živega srebra, glede na pojavnost v eni izmed zgoraj omenjenih oblik.

Preglednica I: Toksikokinetika treh oblik živega srebra (9, 10)

| OBLIKA Hg PROCES | elementarna oblika (Hg⁰) | oblika soli (Hg⁺ ali Hg²⁺) | organska oblika (MeHg) |
|--|---|--|---|
| ABSORPCIJA | - pare: skozi pljuča 80%, skozi kožo minimalna - tekoči (npr. pri razlitju termometra): preko prebavil 0,01% | slaba; 7-15% zaužitega odmerka | zelo dobra; skozi prebavila se absorbira 95% zaužitega MeHg |
| DISTRIBUCIJA, PREHOD SKOZI HEMATO - ENCEFALNO BARIERO (HEB) IN PLACENTO | hitra, v vsa tkiva, prehaja skozi HEB (zaradi dobre lipidotopnosti Hg ⁰) in placento | glavna tarča: ledvice, jetra v manjšem obsegu; prehajanje skozi HEB in placento je zanemarljivo, se pa akumulira v placenti | - v vsa tkiva v 30 urah; 10% preide v možgane, 5% ostane v krvi, signifikanten prehod v placento - c(lasje): 250-krat višja od c(kri) |
| METABOLIZEM | tkivna in eritrocitna katalaza: Hg ⁰ → Hg ²⁺ in sledeča vezava na - SH skupine proteinov | vezava na -SH skupine proteinov, v majhnem obsegu redukcija do Hg ⁰ | - vezava na -SH skupine cisteina: nastanek MeHg- S-Cys, ki posnema metionin → možen prehod HEB in placente z AK prenašalci - demetilacija do anorganske oblike s pomočjo encimov črevesne mikroflore |
| ELIMINACIJA | - Hg ⁰ : 10 % z izdihanim zrakom - anorganski Hg ²⁺ : preko urina in blata, t _{1/2} = 1 - 2 meseca | - z urinom in blatom; prehod v proksimalni tubul (vezava na 2 GSH: GS-Hg-SG ali z AK prenašalci (konjugati s cisteinom: Cys-S-Hg-S- Cys, ki posnema dimerno AK cistin: Cys-S-S-Cys) | značilno enterohepatično kroženje; anorganska oblika Hg ²⁺ se postopoma izloča v 90% preko blata, v 10% pa preko urina |

Pomen okrajšav v tabeli: HEB: hematoencefalna bariera, c: koncentracija, AK: aminokislina, AK prenašalec: aminokislinski prenašalec, GSH: glutation, Cys: cistein.

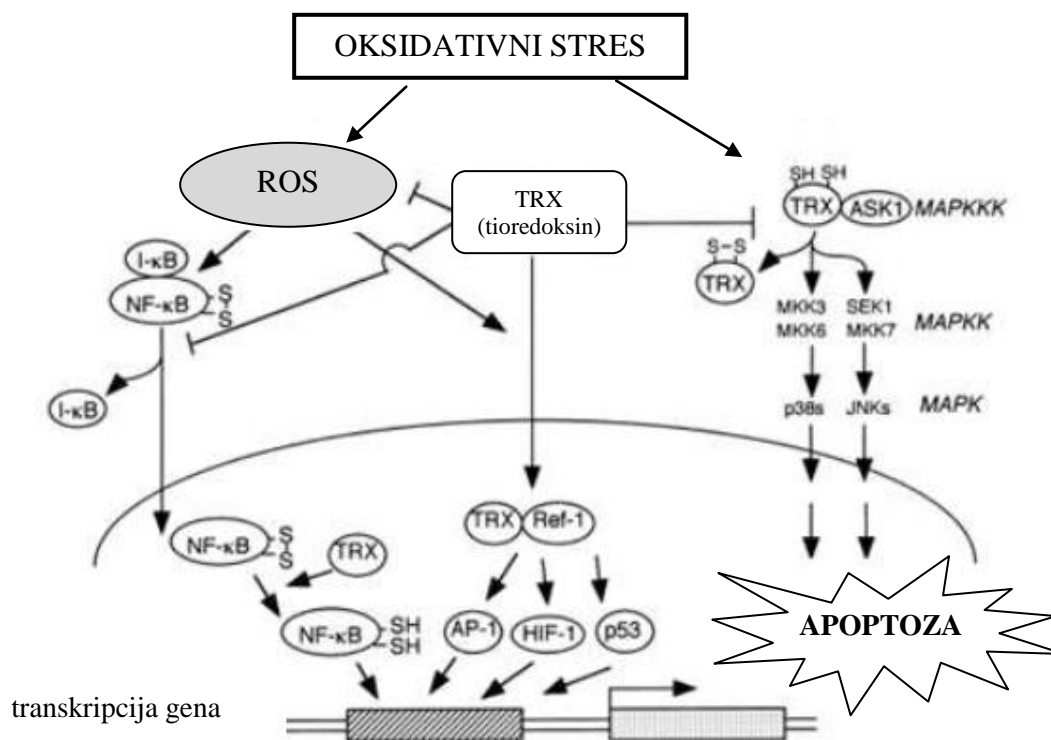
1.4 Mehanizmi toksičnega delovanja živega srebra in toksikodinamika

Škodljivi učinki, ki jih ima živo srebro na tarčne organe v človeškem telesu, v večji meri nastanejo kot posledica lastnosti kovin, da lahko v biološkem sistemu izgubijo enega ali več elektronov in tako tvorijo kation. (12) Iz te lastnosti sledijo naslednji mehanizmi toksičnosti Hg^{2+} in MeHg na molekularnem nivoju (11):

- a) *transport z molekulskimi ali ionskimi prenašalci zaradi posnemanja naravne snovi;*
- b) *vezava na proteine in peptide*, predvsem na -SH skupine metalotioneinov (MTs) in GSH, ki so udeleženi v transport in shranjevanje vseh toksičnih kovin, tudi Hg^{2+} in organske oblike MeHg. S tem pride do nespecifično zavrtih encimskih sistemov ter do okvare celičnih membran.

GSH olajša transport Hg^{2+} in MeHg čez biološke membrane in poveča toksičnost v tarčnem organu. Poleg GSH in MTs pa so v telesu na voljo še drugi proteini, ki tudi vežejo Hg^{2+} in MeHg. (13) Tiorredoksin (TRX) z vlogo, podobno GSH, je podrobneje predstavljen v nadaljevanju diplomske naloge;

- c) *mutagenost in genotoksičnost* (v manjši meri);
- d) *epigenetski učinki* - dedne spremembe v izražanju genov, ki ne povzročijo spremembe zaporedja DNK, npr. metilacija DNK in modifikacije histonov;
- e) *vpliv na celične signalne poti in izražanje genov ter temu sledeča kancerogeneza*; signaliziranje preko reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki so vzrok za porušeno razmerje med oksidanti in antioksidanti v telesu, kar privede do stanja oksidativnega stresa, ter aktivacija z mitogenom aktiviranih protein kinaz (MAPK), ki preko fosforilacije vplivajo na rast, delitev, diferenciacijo, transformacijo in apoptozo celic. Pri kancerogenezi imajo vlogo še signalne poti preko fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K), ki nadzira rast, diferenciacijo in apoptozo celic, poti preko s hipoksijo inducirane faktorja 1 (HIF-1), ki sodeluje pri homeostazi celične oksigenacije, in preko jedrnega faktorja kappa B (NFκB), ki se aktivira po odcepu inhibitorja kappa B, čemur sledi prehod v jedro celic in reguliranje prepisovanja specifičnih genov, udeleženih v mediacijo vnetja, angiogenezi, tvorbi metastaz in apoptozi. Omenjene signalne poti prikazuje slika 3.



Slika 3: Signalne poti, ki sodelujejo pri odzivu celic na oksidativni stres. (14)

ROS: reaktivne kisikove zvrsti, NFκB: jedrni faktor kappa B, IκB: inhibitor jedrnega faktorja kappa B, TRX: tioredoksin, Ref-1: redoks faktor 1, AP-1: aktivatorski protein 1, HIF-1: s hipoksijo inducirani faktor 1, p53: tumorski supresor, MAPK: z mitogenom aktivirana protein kinaza, MAPKK: kinaza MAPK, MAPKK: kinaza kinaze MAPK, JNK: N-terminalna kinaza c-Jun.

Zaradi različnih lastnosti treh oblik Hg, ki pogojujejo njegovo toksikokinetiko, se razlikuje tudi njihov toksični učinek na telo. Pri izpostavljenosti vsaki od oblik v ekvimolarnih količinah so najbolj škodljive organo-živosrebrove spojine s kratko alifatsko verigo, saj lahko povzročijo nepopravljive poškodbe centralnega živčnega sistema (CŽS).

Najbolj raziskana vloga pri razvoju toksičnosti je vloga MeHg, saj prvi zapisi o vplivu MeHg na raziskovalce v laboratorijih segajo že v leto 1863. Skupek simptomov, kot so parestezije, možganska ataksija, disartrija in napredujoče zmanjševanje vidnega polja, so poimenovali Hunter-Russell-ov sindrom. (7)

Nevrološki in psihiatrični simptomi, praktično enaki, kot pri Hunter-Russell-ovem sindromu, ki so se pojavili pri zastrupljenih v Minamati, so dali pečat preimenovanju sindroma v »bolezen Minamata« (7, 15) V Minamati so tudi potrdili, da obstaja vmesno latentno obdobje med izpostavljenostjo MeHg in pojavom simptomov. Na zakasnitveni čas vpliva tako stopnja in trajanje izpostavljenosti, kot tudi individualna občutljivost. Blagi

primeri se končajo z deloma okvarjenimi čutnimi zaznavami, medtem ko se v hujših primerih pojavijo dodatne motorične okvare, periferni skotomi in izguba sluha, čemur v najslabših primerih lahko sledi poslabšanje kognitivnih funkcij, paraliza in celo smrt. (7)

Zaradi vpliva anorganskih oblik Hg (Hg^0 , Hg^+ ali Hg^{2+}) je bila v preteklosti najbolj razširjena akrodinija - otroška bolezen zaradi hipersenzitivne reakcije, pri kateri so bili klinični simptomi naslednji: boleči, pordeli in otekli prsti na rokah in nogah, fotofobija, hipertenzija, splošna telesna slabost in razdražljivost. Danes je ta bolezen zelo redka. (8)

V preglednici II so učinki različnih oblik Hg na organizem opisani ločeno glede na to, ali so specifični za določen organ oz. organski sistem, ali pa so organsko nespecifični.

Preglednica II: Toksikodinamične lastnosti obeh anorganskih (Hg^0 oz. Hg-soli) in organske (MeHg) oblike živega srebra z razdelitvijo glede na tarčno delovanje. Okrajšava n.p. pomeni, da ni podatka.

| OBLIKA Hg | | elementarna oblika (Hg^0) | oblika soli (Hg^+ ali Hg^{2+}) | organska oblika (MeHg) |
|----------------------------|-------------------------------------|---|--|------------------------|
| VRSTA TOKSIČNOSTI | | | | |
| ORGANSKO SPECIFIČNA | IMUNSKI SISTEM | Vse oblike zmanjšajo imunski odziv, povečana je dovzetnost za virusni encefalomiokarditis; izzvan pa je lahko tudi avtoimunski odziv, ki ima vlogo v patogenezi avtizma, ter v avtoimunski odziv, ki se manifestira kot glomerulna nefropatija, zaradi protiteles proti lamininu, ki je sestavina bazalne membrane ledvic. (16) | | |
| | LEDVICE (8) | proteinurija ($> 500 \mu\text{g}$ par Hg^0/m^3 zraka) | tubularna nekroza zaradi spremenjene morfologije mitohondrijev (vezava Hg na -SH skupine proteinov) in zaradi oksidativnega stresa ter disregulacije homeostaze Ca^{2+} (17), upočasnjena hitrost glomerulne filtracije (GFR) | |
| | RESPIRATORNI SISTEM (8) | iritacija bronhiolov, pneumonitis ($> 1000 \mu\text{g}$ par Hg/m^3 zraka) | n.p. | n.p. |
| | GASTROINTESTINALNI TRAKT (8) | kovinski okus, stomatitis, gingivitis, povečano slinjenje ($> 1000 \mu\text{g}$ par Hg/m^3 zraka) | kovinski okus, stomatitis, gastroenteritis | n.p. |
| | PERIFERNI ŽIVČNI SISTEM (8) | periferna nevropatija ($> 500 \mu\text{g}$ par Hg/m^3 zraka) | akrodinija | akrodinija (le EtHg) |

| VRSTA TOKSIČNOSTI | OBLIKA Hg | elementarna oblika (Hg ⁰) | oblika soli (Hg ⁺ ali Hg ²⁺) | organska oblika (MeHg) |
|------------------------------|--|--|---|---|
| | CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM (8) | razdražljivost, poudarjena psihomotorična aktivnost (> 500 µg par Hg/m ³ zraka), tremor | n.p. | parestezija, ataksija, izgube vida in sluha (> 200 µg/L krvi); pojav tunelskega vida zaradi zožitve vidnega polja (degeneracija nevronov vidnega korteksa) (18) |
| ORGANSKO NESPECIFIČNA | RAZVOJNA (PLACENTNA) TOKSIČNOST | | | |
| | <p>SPLOŠNO: PREHOD SNOVI PREKO PLACENTE: Placenta predstavlja stik med materjo in zarodkom in omogoča prenos hrane, plinov, odstranjevanje odpadnih snovi in ohranitev nosečnosti preko zapletene hormonske regulacije. Anatomsko sta cirkulaciji matere in zarodka ločeni s številnimi plastmi celic. Večina snovi se preko placentne bariere prenaša z aktivnim transportom proti koncentracijskemu gradientu (AK, esencialni sladkorji, vitamini, ioni). Toksične snovi pa večinoma prehajajo s pasivno difuzijo, zato pri običajnih pogojih koncentraciji toksične snovi v plazmi matere in zarodka sovpadata. Za določene toksine ima placenta razvit biotransformacijski sistem, s čimer jim prepreči prehod s pasivno difuzijo. (19)</p> <p>PLACENTNA TOKSIČNOST Hg: Ker placento lažje prehajajo bolj lipofilne snovi, sta za placentno toksičnost še posebno problematični obliki Hg⁰ in MeHg. Po prehodu placentne se kopičita v možganih zarodka in povzročata nepravilnosti, ki so posledica škodljivega vpliva na nevronske migracije tekom razvoja zarodka. Gre za poškodbe sivine možganov in malih možganov, ki vodijo v nekrozo nevronov, fagocitozo in gliolizo. V najhujših primerih pride do atrofije možganov. Vse opisane nepravilnosti se pri novorojenčkih lahko pojavijo tudi, če se pri materi, ki je bila v nosečnosti izpostavljena MeHg, niso razvili nobeni toksični simptomi. (20) Simptomi zaradi nevronske nepravilnosti med razvojem pri otrocih vključujejo mentalno in motorično zaostalost, ataksijo, gluhost, slepoto in simptome, podobne cerebralni paralizi. (7)</p> <p>Ker se Hg porazdeljuje tudi v lase matere in zarodka, je c(MeHg) dober biomarker za določitev trenutne in pretekle izpostavljenosti MeHg. V lasih lahko c(MeHg) doseže v primerjavi s plazemskimi koncentracijami kar 250-kratne vrednosti. (7)</p> | | | |

1.5 Oksidativni stres in vpliv toksičnih kovin na organizem nosečnice in razvoj zarodka

Oksidativni stres nastane zaradi neravnotežja med prooksidanti in antioksidanti. Vzrok oksidativnega stresa v organizmu je prekomerna tvorba radikalov in ostalih reaktivnih kisikovih ali dušikovih spojin (ROS ali RNS), lahko pa gre tudi za nezadosten obrambni antioksidantni sistem. Povzroči lahko neželene poškodbe bioloških molekul.

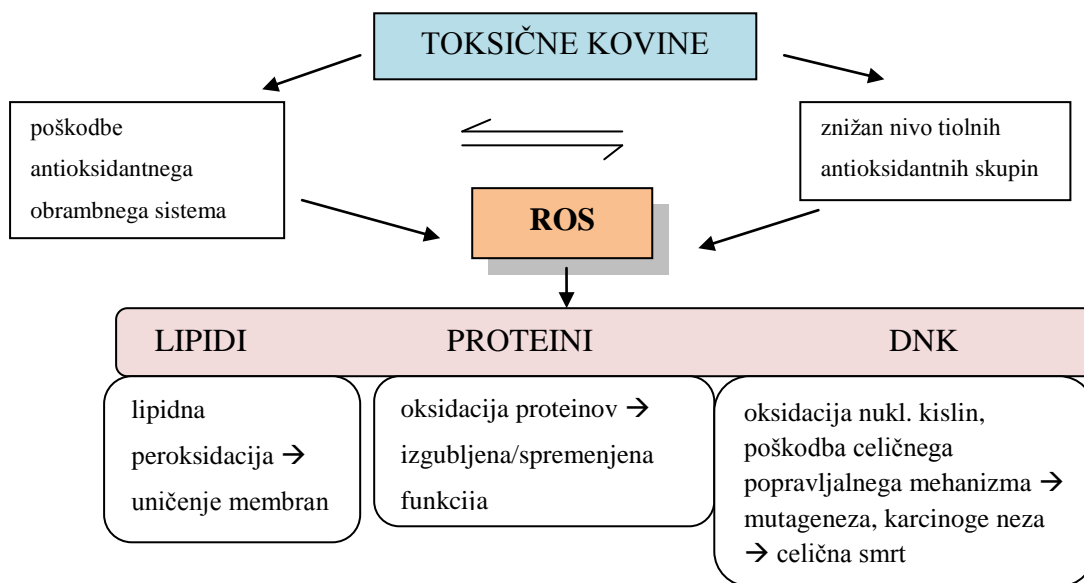
Nosečnost je zaradi povečane metabolične aktivnosti in zmanjšane moči antioksidantov stanje povišanega oksidativnega stresa. Motnje oksidativnega ravnotežja v nosečnosti lahko vodijo v nastanek motenj v razvoju zarodka in kasneje ploda. Ključno vlogo pri tvorbi ROS in uravnavanju intrauterinega oksidativnega ravnotežja v nosečnosti ima posteljica, ki predstavlja pomemben vmesnik med materinim in fetalnim krvnim obtokom, saj prenaša kisik in številne metabolične substrate. (21)

Organizem se pred škodljivim vplivom radikalov brani z antioksidantnimi molekulami, ki vežejo radikalske zvrsti ter jih s tem naredijo stabilnejše in manj reaktivne. Antioksidanti v organizmu so tako encimski kot tudi ne-encimski in so predstavljeni v preglednici št. III.

Preglednica III: Pregled celičnih antioksidantov (22)

| ENCIMSKI | NE-ENCIMSKI |
|---|------------------|
| superoksidna dismutaza (SOD) | vitamin C in E |
| katalaza (CAT) | lipojska kislina |
| glutation peroksidaza (GPX) in glutacion reduktaza (GR) | glutacion (GSH) |
| glutaredoksin (GRX) | katehini |
| tiorredoksin (TRX) in TrX reduktaza (TrxR) | melatonin |

Toksične kovine, kot so Hg, Pb, Cd, in As, pomembno vplivajo na rušenje antioksidantnega ravnovesja v organizmu, saj se vežejo na glavne celične antioksidante, predvsem na tiste z vsebujočo tiolno (-SH) skupino. Na ta način znižujejo koncentracijo prostih antioksidantov v telesu, ki so sicer na voljo za vezavo škodljivih radikalskih zvrsti, posledice pa so prikazane na sliki 4. (23)



Slika 4: Škodljivi učinki toksičnih kovin preko generacije ROS. (23)

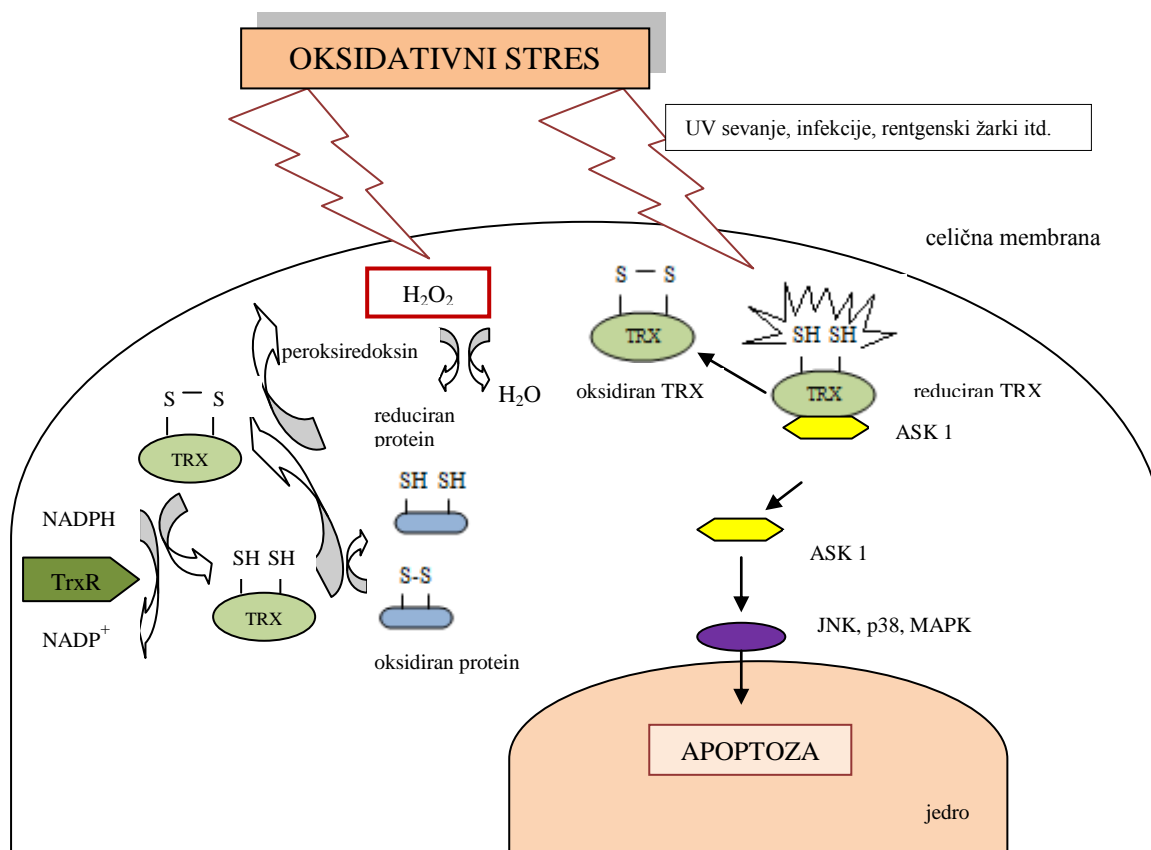
1.5.1 Tioredoksinski in glutationski antioksidantni sistem

V celicah sta za uravnavanje redoks stanja odgovorna dva medsebojno povezana sistema: tioredoksinski (TRX) sistem in glutationski (GSH) sistem, ki v fizioloških pogojih ohranjata reducirajoče znotrajcelično okolje preko disulfidnih/ditiolnih redoks reakcij. Medtem, ko je GSH cistein vsebujoči tripeptid (γ -glutamil-cisteinil-glicin) in je v milimolarnih količinah najpomembnejši citosolni antioksidant, je TRX majhen protein, prisoten le v mikromolarnih količinah. V aktivnem mestu vsebuje dva redoks-aktivna ostanka cisteina

(-Cys-Gly-Pro-Cys-) in učinkovito deluje kot reducirajoči sistem proteinskih disulfidov skupaj z NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom) in tioredoksin reduktazo (TrxR). Pomembno vlogo ima tudi pri regulaciji apoptoze. (24)

Preizkus diferencialne oksidacije TRX in GSH sistemov s Hg^{2+} ioni je pokazal, da ne pride do enakih učinkov na omenjena sistema. Medtem, ko je Hg^{2+} oksidirala TRX v znatnem obsegu, čemur je sledila aktivacija ASK-1 in apoptoza, pa je bila pri GSH vidna le nizka stopnja oksidacije. Iz tega sledi, da se sistema vpletata v kontrolo signalnih poti na različnih nivojih in da je TRX sistem v večji meri udeležen pri regulaciji celične smrti, ki jo inducirajo toksične kovine. (25, 26)

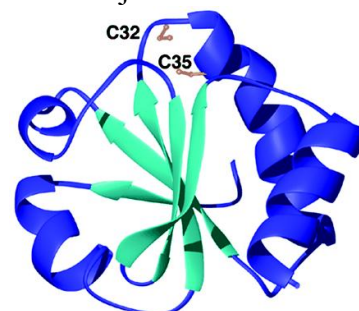
Na sliki 5 so prikazane kaskade reakcij, kjer je udeležen TRX, in ki sledijo izpostavljenosti organizma oksidativnemu stresu.



Slika 5: Vloga TRX sistema in drugih vpletenih molekul v regulacijo apoptoze in obnovo oksidiranih proteinov. TRX deluje v povezanosti z NADPH in TrxR ter družino od TRX neodvisnih peroksidaz (peroksiredoksinov), s katerimi razgradi znotrajcelični H_2O_2 in s tem ščiti celico pred oksidativnim stresom. Poleg tega TRX interagira s pomembnim regulatorjem apoptoze - je inhibitor regulatorne kinaze apoptoznega signala 1 (ASK1); ko je TRX v oksidiranem stanju zaradi vpliva oksidativnega stresa, se ASK1 sprosti iz kompleksa z oksidiranim TRX in je tako aktivirana za sprožitev signala za apoptozo preko signalnih molekul N-terminalne kinaze c-Jun (JNK) in p38 MAPK. (24)

1.5.2 Tioredoksin

Tioredoksin je majhen protein z dvema cisteinskima ostankoma, ki sta redoks aktivna. Gre za Cys-32 in Cys-35. Njegova tridimenzionalna struktura na sliki 6 razkriva, da je sestavljen iz petih β -upognjenih ravnin, ki so obdane s štirimi kratkimi α -vijačnicami. Pri človeku je bil tioredoksin prvič odkrit v pozitivnih T-celičnih linijah virusa levkemije človeških T-celic tipa I (HTLV-I). (24)



Slika 6: NMR struktura tioredoksina izoliranega iz *E. coli*. Aktivni mesti (Cys-32 in Cys-35) sta posebej označeni. (27)

Znane so tri izoforme tioredoksina, ki se razlikujejo po nahajališču v celici in po velikosti:

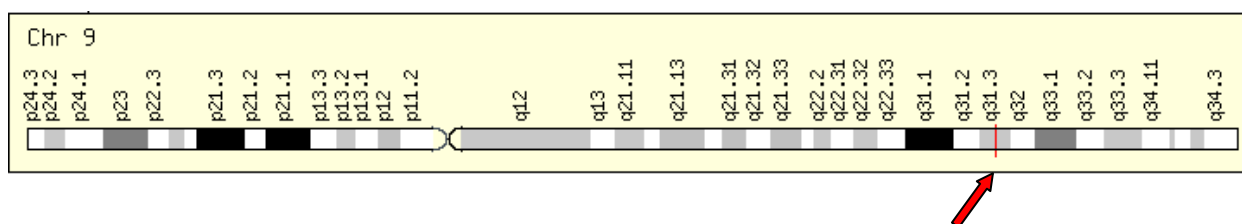
- tioredoksin-1 (TRX-1): citoplazemski TRX z maso 12 kDa,
- tioredoksin-2 (TRX-2): mitohondrijski TRX z maso 18 kDa,
- tioredoksin -3 (TRX-3): novo odkrita mitohondrijska oblika TRX iz kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*). (28)

TRX se nahaja v dveh oblikah; v oksidirani (Trx-S-S) obliki ali reducirani (TRX-(SH)₂) obliki, v kateri deluje kot proteinska disulfidna oksidoreduktaza. Reducirana oblika se obnavlja kot posledica delovanja TrxR in kofaktorja NADPH. Večina TRX se nahaja v keratinocitih epidermisa, kjer varuje pred poškodbami zaradi UV-B žarkov, ter v endotelijskih celicah tako velikih kot tudi mikro-žil. (28) V endotelni celici je udeležen v S-nitrozilacijo cisteinov številnih proteinov, kar je del odgovora na znotrajcelični NO. Sam TRX je v normalnih pogojih S-nitroziliran na mestu Cys-69, kar je nujen pogoj za reagiranje z ROS in za ohranjanje regulatorne redoks aktivnosti TRX. (29)

Nivo TRX se poveča pri številnih boleznih: pri kardiovaskularnih obolenjih, astmi, hepatitisu, infekciji s HIV, revmatoidnem artritisu ter različnih rakavih obolenjih (bronhialne metaplazije, nedrobnocelični rak pljuč, karcinom ledvičnih celic, melanom, kolorektalni rak). Pri večini obolenj gre za povečano redoks neravnovesje v organizmu. Višja koncentracija TRX se pojavi tudi kot posledica terapije s kemoterapevtiki. (29)

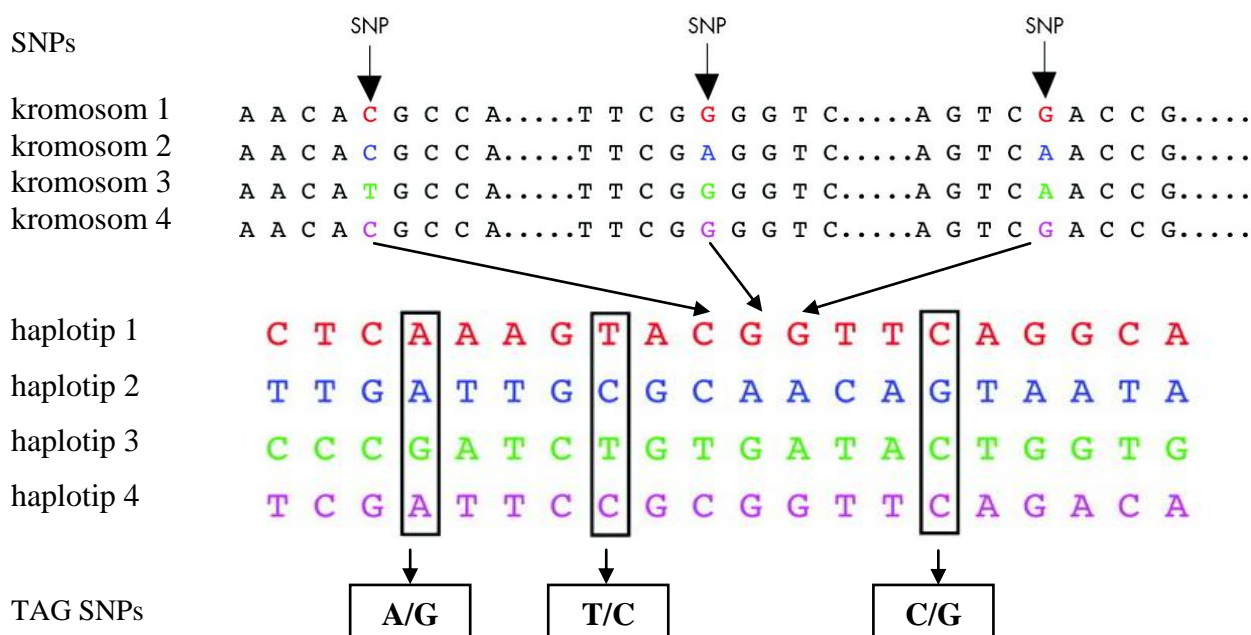
Poleg antioksidantne vloge in vpletenosti v proces apoptoze ima TRX tudi številne druge funkcije. Vpleta se v sintezo DNA, saj je redukcijski partner ribonukleotid reduktaze in s tem pomaga pri tvorbi deoksiribonukleotidov. (30) Ojača vezavno aktivnost transkripcijskih faktorjev, kot so NFκB, AP-1 in p53, preko katerih je TRX vpleten v celično rast in celične popravilne mehanizme. (28, 31) Vpleten je tudi v angiogenezo, saj inducira s hipoksijo inducirani faktor 1 α (HIF1α) ter poveča ekspresijo gena za žilni endotelijski rastni faktor (VEGF). (28)

Gen *TRX* se pri človeku nahaja na kromosomu 9 in ga sestavlja 105 AK. S puščico je označen na sliki 7.



Slika 7: Lokacija gena za TRX pri človeku. (32)

V okviru študij so odkrili preko 300 polimorfizmov v genu *TRX*. (33) Gre za pojav enonukleotidnih polimorfizmov (angl. single - nucleotid polymorphisms oz. SNPs) - sprememba enega nukleotida v genomu. Za tiste SNP, ki so v neposredni bližini, je velika verjetnost, da se dedujejo vezano, zato lahko na tej osnovi ustvarimo haplotipe (kromosomske regije). Vodilni polimorfizem, ki je najbolj značilen za določen haplotip, imenujemo tag-polimorfizem. Z analizo tag-polimorfizmov si zožamo nabor kandidatnih SNPov za testiranje, saj jih lahko napovemo na podlagi tag-polimorfizmov. (34) Na sliki 8 je shematsko prikazan nabor različnih SNP in izbor tag-polimorfizmov.



Slika 8: Različice gena, ki so si po lokaciji blizu, se dedujejo skupaj. Primer: vsi, ki imajo na nekem mestu v kromosomu A namesto G, imajo s precejšno verjetnostjo enake alelne variante tudi na drugih SNP, ki so blizu A. Te regije povezanih alelnih variant se imenujejo haplotipi. (35)

Študije preučevanja vloge polimorfizmov so pokazale povezanost s povečanim tveganjem za raka dojke za naslednje polimorfizme v genu *TRX1*: rs2301241 (-795A>G, polimorfizem, ki ga bomo preučevali tudi v tej diplomski nalogi), v genu *TRX2* pa rs2267337, rs2281082 in rs4821494. (36) Vloge polimorfizmov so preučevali tudi v povezavi z avtizmom, povišano telesno maso, osteoporozo, Alzheimerjevo boleznijo, revmatoidnim artritisom in okužbo s HIV. Ker oksidativni stres vpliva na poškodbo beta celic trebušne slinavke, s čimer je povezan razvoj sladkorne bolezni tipa I, imajo polimorfizmi v genu *TRX* vlogo pri razvoju te bolezni. Na Japonskem so povezanost potrdili v študiji na bolnikih z diabetesom tipa I, pri katerih so preučili frekvenco posameznega genotipa G/A polimorfizma rs2776

(12496C>T, polimorfizem, ki ga bomo preučevali tudi v tej diplomski nalogi) v 3'-UTR regiji gena *TRX1*. Pri alelni različici A (oz. T na komplementarni verigi) je bil značilno večji delež bolnikov s sladkorno boleznijo tipa I. (37)

V veliki primerjalni študiji v Kaliforniji v ZDA, so odkrili tudi insercijsko/delecijski (Ins/Del) polimorfizem v proksimalni promocijski regiji gena *TRX2*. Ugotovili so, da so GA, G in GGGA insercije povezane z občutnim upadom transkripcijske aktivnosti, nadalje pa tudi, da je insercija GA povezana s povečanim tveganjem za razvoj spine bifide pri novorojenčkih, t.j. nezraščeni zadnjega dela hrbtenice, kjer so zato izpostavljeni hrbtne možgane in meninge. To potrjuje vpletenost TRX pri nevronskega razvoja in utero, v tem primeru konkretno pri zapiranju nevrovalne cevi. (38)

Svojo obrambno vlogo pri oksidativnem stresu TRX izkazuje tudi pri bakteriji *Helicobacter pylori*. Ta za preživetje v notranjem okolju svojega gostitelja, bogatim z ROS in RNS, potrebuje močan rezistentni odgovor preko antioksidantnih encimov. Ključno vlogo za preživetje tega mikroorganizma v prebavnem traktu ljudi ima TRX sistem. (39)

Zanimivo bi bilo preučiti, kako izbrana preučevana polimorfizma, ki sta del nekodirajoče regije 3'-UTR (angl. *untranslated region*) v genu *TRX*, vplivata na gensko ekspresijo, izrezovanje genskih segmentov in ali se redoks funkcija TRX spremeni glede na posamezen genotip preučevanih polimorfizmov. Drugačno zvijanje proteina bi lahko imelo za posledico različen (slabši ali boljši) antioksidantni odgovor TRX sistema ob izpostavljenosti Hg^{2+} in MeHg preko razpoložljivosti obeh -SH skupin v TRX.

2. NAMEN DELA

Tioredoxin je del pomembnega antioksidantnega sistema v človeškem telesu. V uvodu pojasnjen vpliv Hg^{2+} in MeHg na zmanjšano koncentracijo endogenih molekul s prostimi tiolnimi skupinami in posledično znižano antioksidantno zaščito organizma pred ROS in RNS bomo preučili v povezavi z dvema polimorfizmoma v genu *TRX* pri nosečnicah in novorojenčkih.

Namen diplomskega dela je ugotoviti, **ali obstaja statistično značilna povezanost med tag-polimorfizmoma -795A>G (rs 2301241) in 12496C>T (rs2776) v genu *TRX* ter koncentracijami Hg^{2+} in MeHg, izmerjenimi v krvi, laseh, mleku in urinu mater, popkovnični krvi ter urinu novorojenčkov.** Preverili bomo tudi prisotnost ostalih toksičnih kovin (Pb, Cd, Mn, Zn, As) in jih vključili kot kovariate.

Vključno z genetskimi faktorji bomo v analizi rezultatov upoštevali tudi okoljske faktorje pri materah, kot so starost ob porodu, kajenje, indeks telesne mase (ITM), pogostnost uživanja rib, količina polinenasičenih maščobnih kislinih (angl. PUFA - *polyunsaturated fatty acids*) v krvi in razpoložljivost esencialnega elementa selena v krvi in mleku nosečnic ter v popkovnični krvi. Vsi omenjeni parametri (z izjemo PUFA, ki imajo varovalno vlogo) lahko poleg polimorfizmov v genu *TRX* vplivajo na povečan nivo oksidativnega stresa pri materah. Prav tako bomo preverili morebitno povezanost naštetih parametrov s polimorfizmoma v DNK novorojenčkov.

Delo bo po izolaciji DNK iz popkovničnega tkiva novorojenčka in materine venske krvi obsegalo pomnoževanje tarčnih odsekov DNK in sočasno alelna diskriminacijo vzorcev s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. *real time polymerase chain reaction* oz. *quantitative PCR - qPCR*). Vpliv polimorfizmov bomo ocenili s statistično obdelavo podatkov z izbranim statističnim programom. Iskali bomo značilne povezave med preučevanima polimorfizmoma in omenjenimi parametri.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovana populacija

- Hrvaška populacija: 213 mater in 179 novorojenčkov.
- Slovenska populacija: 431 novorojenčkov.

Obravnavane so posebej matere in posebej otroci (najprej ločeno po državah, nato pa še vsi otroci združeno skupaj). Skupno število mater je tako 213, skupno število otrok pa 610.

Materam iz Hrvaške so bili na kontrolnih pregledih odvzeti vzorci periferne venske krvi in las v Kliničkem bolniškem centru Klinike za ginekologijo in porodništvo v Reki. Ob rojstvu otrok je bila odvzeta popkovnična kri ter tkivni vzorci popkovine. Za nadaljnje analize so bili lasje nosečnic shranjeni na sobni temperaturi, vzorci krvi in popkovine pa na -20°C . Od mater so bili pridobljeni tudi podatki glede starosti, kajenja, uživanja rib ter višina in teža, preko katerih smo izračunali indeks telesne mase (ITM) preiskovank.

Vse preiskovanke so predhodno soglašale z vključitvijo njihovh vzorcev v študijo, ki je bila odobrena s strani etične komisije v Sloveniji in na Hrvaškem.

3.2 Določanje koncentracije Hg^{2+} in MeHg

Meritve koncentracij Hg^{2+} in MeHg v odvzetih vzorcih so napravili na inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani.

Koncentracije Hg^{2+} v laseh (hHg), mleku (milkHg), krvi (mHg) in urinu (muHg) mater in urinu novorojenčkov (buHg) ter popkovnični krvi (cordHg) so določili z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS). Metoda temelji na merjenju količine svetlobe, ki jo absorbira vzorec. Vzorec pred analizo uparimo in atomiziramo s plamenom. Nato skozi plamen posvetimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine, čemur sledi merjenje deleža prepuščene svetlobe. Meritve so bile opravljene na napravi Direct Mercury Analyzer (Milestone Srl, Italija).

Koncentracijo MeHg v laseh (hMeHg) so določili z metodo plinske kromatografije z detektorjem na zajetje elektronov (angl. *gas chromatography - electron capture detector* oz. GC-ECD), pri čemer je princip za merjenje odziva zasnovan na nastanku aniona eluirane spojine zaradi obsevanja z beta delci. Uporabljena naprava je bil GC-ECD, HP 5890, Hewlett Packard, ZDA.

Koncentracija MeHg v venski krvi mater in popkovnični krvi (mMeHg oz. cordMeHg) je bila po predhodni ekstrakciji, etilaciji in ločitvi s plinsko kromatografijo določena z metodo CV-AFS (atomska fluorescenčna spektrometrija hladnih par, angl. *cold vapor-atomic fluorescence spectrometry*) na napravi Brooks Rand Labs (Model I), ZDA.

3.3 Določanje koncentracije ostalih kovin, arzena, selena in PUFA

Koncentracije cinka (Zn), mangana (Mn), svineca (Pb), kadmija (Cd) in arzena (As) so določili z metodo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (angl. *inductively coupled plasma mass spectrometry* oz. ICP MS). Princip metode je, da komponente vzorca ioniziramo s pomočjo izvora induktivno sklopljene plazme. Nastali ioni so nato usmerjeni na masni spektrometer, ki ione analizira (loči med seboj in jih kvantificira) glede na razmerje masa/naboj. Meritve so bile narejene na napravi Octapole Reaction System (ORS) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, 7500ce, Agilent.

Koncentracije selena (Se) so bile izmerjene po predhodni mineralizaciji s segrevanjem in dodatkom HNO₃/H₂SO₄. Detekcija je temeljila na metodi hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS, angl. *Hydride generation atomic fluorescence spectrometry*). Pri tej metodi najprej nastane hlapni hidrid selena, ki ga nato nosilni plin odnese v plamen vodika. Hidrid v atomizatorju razpade in nastali atomi selena fluorescirajo svetlobo karakteristične valovne dolžine, ki jo zazna fluorescenčni detektor.

Koncentracije PUFA so določili z metodo transesterifikacije *in situ* in sledeče detekcije s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID, angl. *gas chromatography - flame ionisation detector*). Pri sežigu organskih snovi v plamenu nastajajo nabiti delci (ioni in elektroni), zaradi katerih na kolektorsko elektrodo steče električni tok, ki je proporcionalen količini analita v nosilnem plinu.

3.4 Izolacija DNK

Genomsko DNK novorojenčkov smo izolirali iz popkovničnega tkiva, odvzetega ob rojstvu. Uporabili smo reagente iz kompleta QIAamp DNA Mini Kit proizvajalca QIAGEN, ZDA, in izolacijo izvedli po protokolu *DNA purification from tissues* iz priročnika *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 04/2010*. (40)

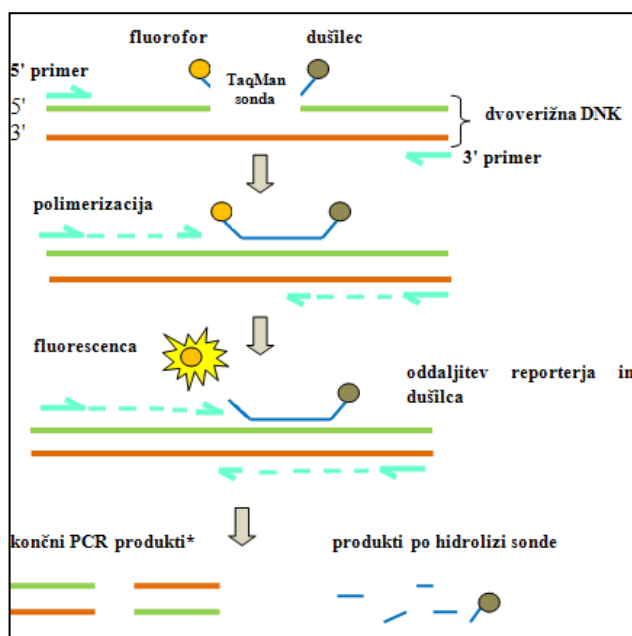
Genomska DNK nosečnic je bila že izolirana iz levkocitov periferne venske krvi.

Uporabljeni reagenti so bili iz kompleta izdelovalca Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit). Izolirana DNK mater je bila nadalje redčena v razmerju 1:20 z ultra čisto vodo, DNK novorojenčkov pa zaradi nižjih koncentracij nismo dodatno redčili. Takšne vzorce smo hranili na -20°C za kasnejšo izvedbo qPCR reakcij. Koncentracije izoliranih DNK smo izmerili z spektrofotometrom NanoDrop (ND1000, ZDA) pri valovni dolžini 260 nm, s čimer smo preverili uspešnost izolacije. Čistost izolirane DNK smo preverili s količnikom izmerjenih absorbanc pri 260 in 280 nm.

3.5 Alelna diskriminacija z uporabo TaqMan[®] sond

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je nadgradnja običajne PCR reakcije. Pomnoževanje in detekcija potekata sočasno. Detekcija temelji na merjenju fluorescence, ki smo jo zagotovili z uporabo specifičnih genotipizacijskih sond.

TaqMan[®] sonda je zasnovana tako, da se prilega specifičnemu zaporedju DNK, ki je znotraj med obema zaporedjema, kamor se prilegajo oligonukleotidni začetniki. 5'-konec in 3'-konec ima označena s fluorescenčnima barviloma. Na enem koncu ima sonda poročevalec (angl. *reporter*), na drugem pa dušilec (angl. *quencher*). Pri intaktni sondi, ko sta dušilec in poročevalec dovolj skupaj, se fluorescence iz poročevalca prenaša na dušilec, ki absorbira signal. Zato fluorescence ne moremo zaznati. Pojav imenujemo FRET (angl. *fluorescent resonant energy transfer*). Med podaljševanjem verige Taq DNK polimeraza s svojo 5'-eksonukleazno aktivnostjo hidrolizira vezano sondo, pri čemer se molekuli poročevalca in dušilca razideta in zato lahko emitirano fluorescenco poročevalca detektiramo. Z vsakim ciklom se intenziteta fluorescence povečuje. Potek reakcije prikazuje slika 9.



Slika 9: Shematski prikaz poteka qPCR reakcije in principa detekcije s fluorescenčno sondjo. (41)

*Število produktov: 2^n , pri čemer je n enako številu ciklov podvajanja.

Uporabili smo dve različni poročevalski barvili; FAM[®] za prvi alel in VIC[®] za drugi alel. Vsaka izmed različno označenih sond se namreč veže le na eno varianto alela. Na tem principu je temeljila alelna diskriminacija oz. genotipizacija vzorcev v tem diplomskem delu.

3.5.1 Priprava vzorcev za qPCR reakcijo

- **Aparature in pribor:**

- laboratorijske rokavice brez smukca (Kimberly Clark, Texas, ZDA)
- laboratorijska halja (Deloza, Celje, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija)
- škatlice s predhodno avtoklaviranimi nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- delovna komora za PCR z UV svetlobno sterilizacijo (Biosan DNA/RNA UV cleaner, Latvija)
- plastični vsebniki s cevko, polnjeni z natrijevim hipokloritom
- centrifuga (FVL-2400 N, Combi Spin, Biosan, Latvija)
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL; Eppendorf, Nemčija)
- multikanalna pipeta z 12 nastavki (0,5-10 µL, Eppendorf, Nemčija)
- majhne epruvete s pokrovčkom (0,5 mL in 1.5 mL; Eppendorf, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami (16x24) (MicroAmp[®] Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA)
- centrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- neprodušna samolepilna folija LightCycler[®] 480 Sealing Foil, Roche, ZDA
- qPCR naprava: LightCycler[®] 480 II Real-Time PCR System, Roche, ZDA
- računalniški program Exor for research, 2011

- **Postopek priprave vzorcev:**

Uspešnost reakcije pomnoževanja je v veliki meri odvisna od same priprave vzorcev, pri kateri moramo biti zelo previdni, da ne povzročimo kontaminacije vzorcev s tujo DNK. Pri tem bi prišlo do nespecifičnega pomnoževanja in nastali produkti bi bili neuporabni za končno genotipizacijo. V izogib temu smo vzorce po prenosu iz zamrzovalnika nadalje pripravljali v posebnem prostoru, kjer je gibanje omejeno. Zaščiteni smo bili z

laboratorijsko haljo in rokavicami brez smukca. Celotna priprava vzorcev pred prenosom mikrotitrne ploščice v LightCycler[®] napravo je potekala v delovni komori.

Pred začetkom rokovanja z vzorci smo s 3% raztopino natrijevega hipoklorita očistili komoro, pipete, škatlice s predhodno avtoklaviranimi pipetnimi nastavki ter steklene vsebnike z majhnimi epruветami s pokrovčkom, nato pa vse pripomočke v komori sterilizirali še z UV svetlobo, ki jo je komora oddajala 20 minut. Sledil je prenos DNK vzorcev, sond in destilirane vode iz zamrzovalnika, da so se medtem odtalili. TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, ki vsebuje vse potrebne komponente za potek PCR reakcije (AmpliTaq Gold[®] ultračista DNK polimeraza, dNTP, pufer optimizirane sestave in ROX pasivna referenca za normalizacijo reporterskega signala tekom analize) pa smo vzeli iz hladilnika tik pred uporabo. Po 20 minutah smo v komori izklopili vir UV svetlobe in pričeli s pripravo reakcijske zmesi za qPCR reakcijo po protokolu za določanje s TaqMan[®] SNP Genotyping sondami. Predstavljen je v preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za qPCR reakcijo po protokolu za TaqMan[®] SNP Genotyping sonde

| REAGENT | VOLUMEN REAGENTA/VZOREC |
|---|-------------------------|
| TaqMan[®] Universal PCR Master Mix | 5 µl |
| TaqMan[®] SNP Genotyping assay C__3194436_10 oz. C__15756075_10 | 0,25 µl |
| dH₂O | 3,75 µl |
| genomska DNK | 1 µl |
| končni volumen reakcijske zmesi/vzorec | 10 µl |

Delo smo si olajšali tako, da smo pripravili skupen volumen reagentov za željeno število DNK vzorcev brez dodane DNK. Po dodatku vsakega reagenta smo epruветko dobro premešali in centrifugirali. Nato smo v mikrotitrsko ploščico z multikanalno pipeto prenesli po 9 µl pripravljene reakcijske zmesi brez DNK v vsako posamezno vdolbinico. Sledil je še dodatek po 1 µl vzorcev DNK. V eno vdolbinico smo namesto 1 µl DNK dodali 1 µl dH₂O. Odsotnost pomnoževanja v tem slepem vzorcu je pomenilo specifičnost reakcije

oz. dokaz, da med ostalimi komponentami reakcijske zmesi ne pride do interference (ni prisotne DNK, ki bi kontaminirala vzorec).

Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščico smo prekrili z neprodušno samolepilno folijo, da bi še dodatno preprečili možnost nadaljnje kontaminacije vzorcev med samo reakcijo. Ploščico smo nato centrifugirali, potem pa prenesli v qPCR napravo LightCycler®.

- **TaqMan® SNP Genotyping sondi za genotipizacijo**

Za polimorfizem 12496C>T (42):

ID številka sonde C__3194436_10, dbSNP ID rs2776

Sekvenčni okvir ([VIC/FAM]):

ATTTATTTTGAAGCTATTCAGACA[C/T]GAGACGGTTTTAAAAAGTGTTAGCA

Za polimorfizem -795A>G (43):

ID številka sonde C__15756075_10, dbSNP ID rs2301241

Sekvenčni okvir ([VIC/FAM]):

GACCCTGGAAAGGTCCTGACCTCCT[A/G]AAGTCTCAGTGTTTCCTTCTGTAGA

3.5.2 Potek qPCR reakcije

Ko smo ploščico vstavili v LightCycler®, smo zagnali temperaturni program, kakršnega narekuje protokol proizvajalca. Predstavljen je v preglednici V.

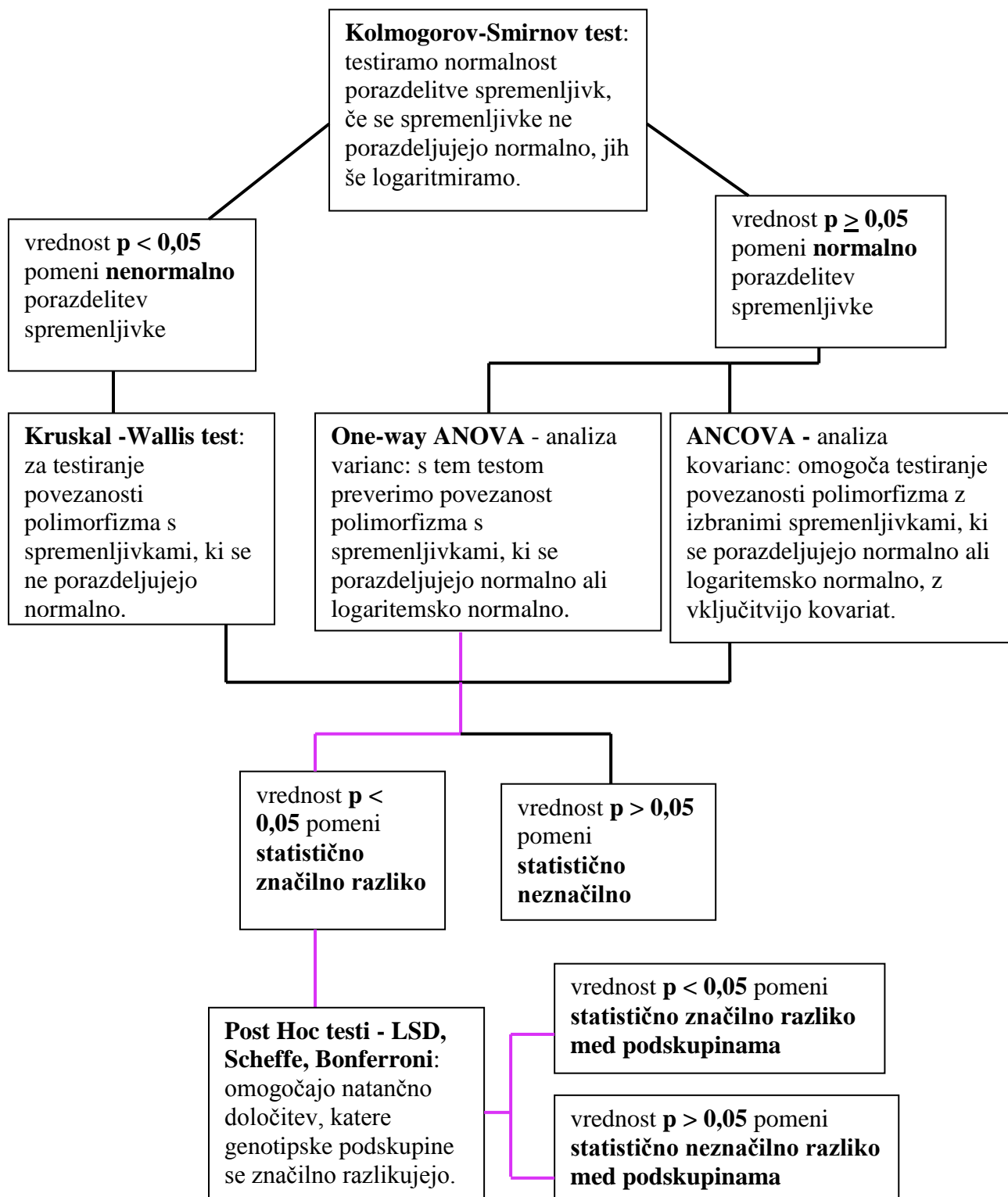
Preglednica V: Temperaturni program qPCR reakcije

| faza reakcije | Preinkubacija | Denaturacija | Prileganje in izgradnja komplementarne verige DNK | Končno ohlajanje |
|---------------|---------------|--------------|---|------------------|
| čas | 10 minut | 15 sekund | 1 minuta | 30 sekund |
| T (°C) | 95 | 92 | 60 | 40 |
| 50 ciklov | | | | |

Po končani qPCR reakciji smo s pomočjo programa *Exor for research 2011* določili genotip za vsak posamezni vzorec.

3.6 Statistične metode

Za statistično analizo podatkov smo uporabili program SPSS Statistics 17.0. Teste smo izvajali v skladu z algoritmom, ki ga predstavlja slika 10.



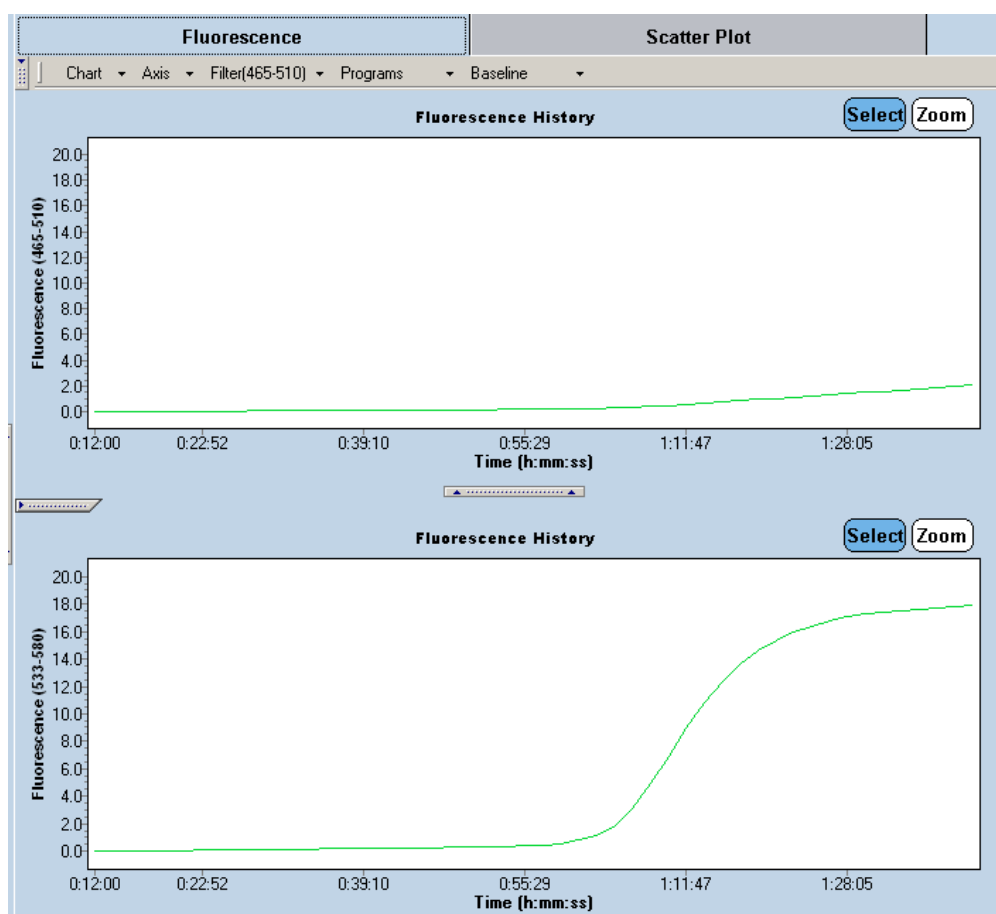
Slika 10: Algoritem statističnih testov, ki smo jih izvajali pri obravnavi rezultatov. (44)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Rezultati alelne diskriminacije

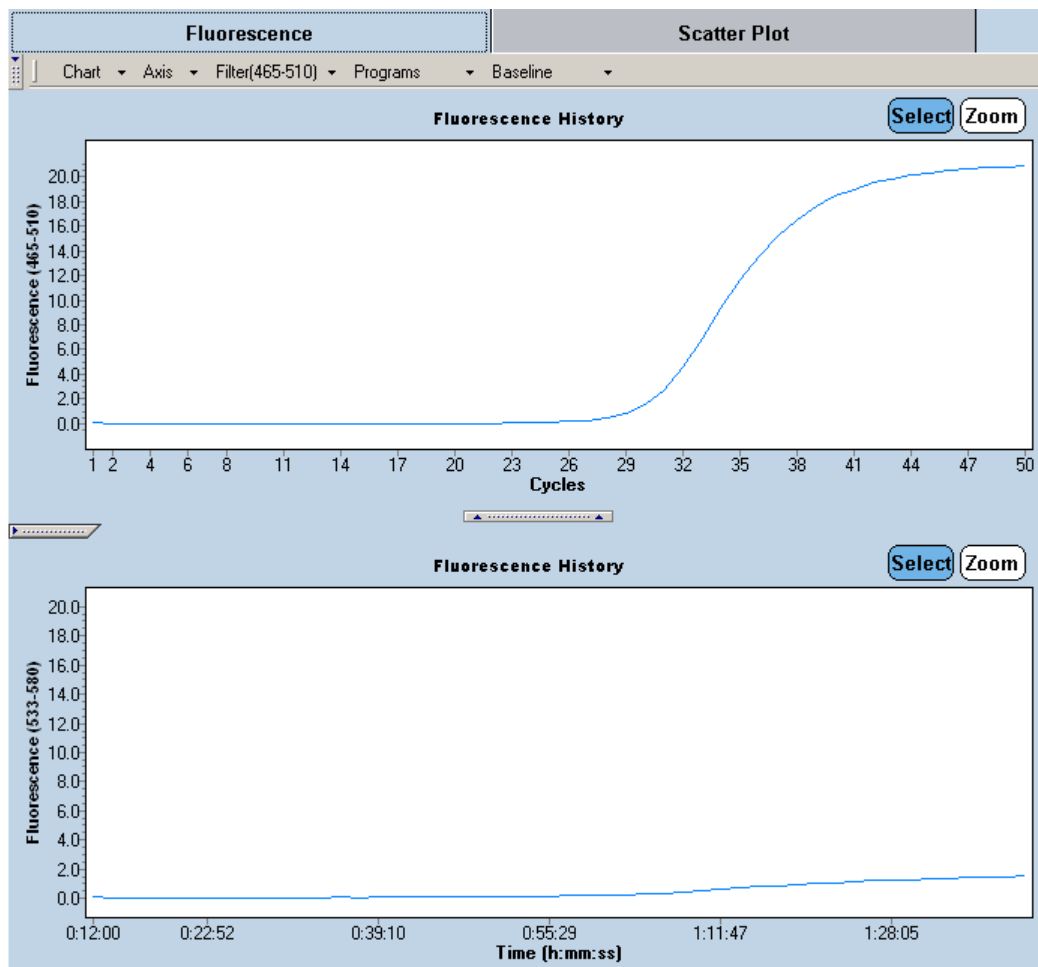
Izbrani fluorescenčni barvili VIC[®] (valovna dolžina emitirane svetlobe je med 535 in 580 nm) in FAM[®] (valovna dolžina emitirane svetlobe je med 465 in 510 nm) s povečanjem fluorescence podata odgovor, kateri alel je prisoten v vzorcu. Kot rezultat alelne diskriminacije lahko dobimo tri možne različice, prikazane na slikah 11, 12 in 13.

1) *homozigot za alel 1: porast fluorescence le za barvilo VIC[®]*



Slika 11: Krivulje fluorescence po končani qPCR reakciji. Odziv daje barvilo VIC[®], kar je dokaz za prvo homozigotno različico na preiskovanem alelu.

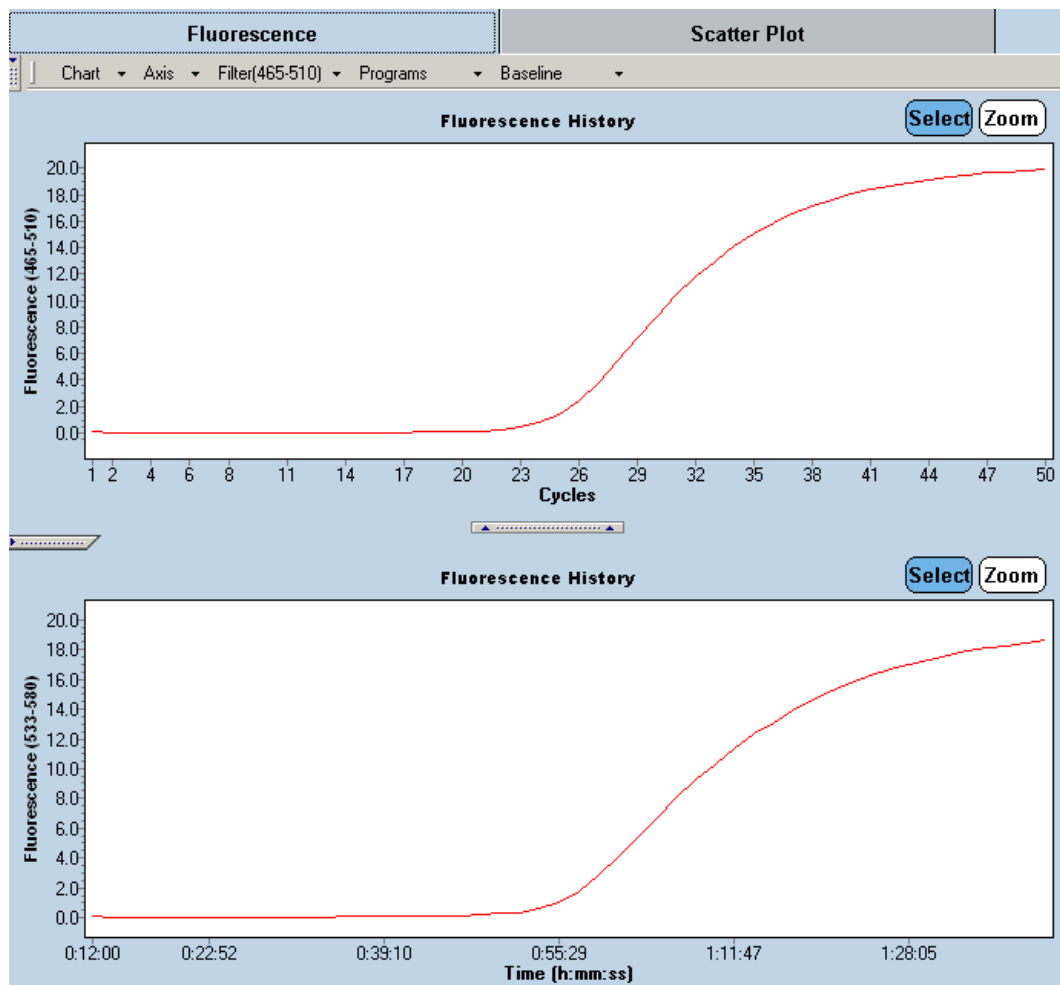
V primeru polimorfizma rs2776 oz. 12496C>T je takšen rezultat pomenil prisotnost genotipa CC, pri polimorfizmu rs2301241 oz. -795A>G pa prisotnost genotipa AA.

2) *homozigot za alel 2: porast fluorescence le za barvilo FAM[®]*

Slika 12: Krivulje fluorescence po končani qPCR reakciji. Odziv daje barvilo FAM[®], kar je dokaz za drugo homozigotno različico na preiskovanem alelu.

V primeru polimorfizma rs2776 oz. 12496C>T je takšen rezultat pomenil prisotnost genotipa TT, pri polimorfizmu rs2301241 oz. -795A>G pa prisotnost genotipa GG.

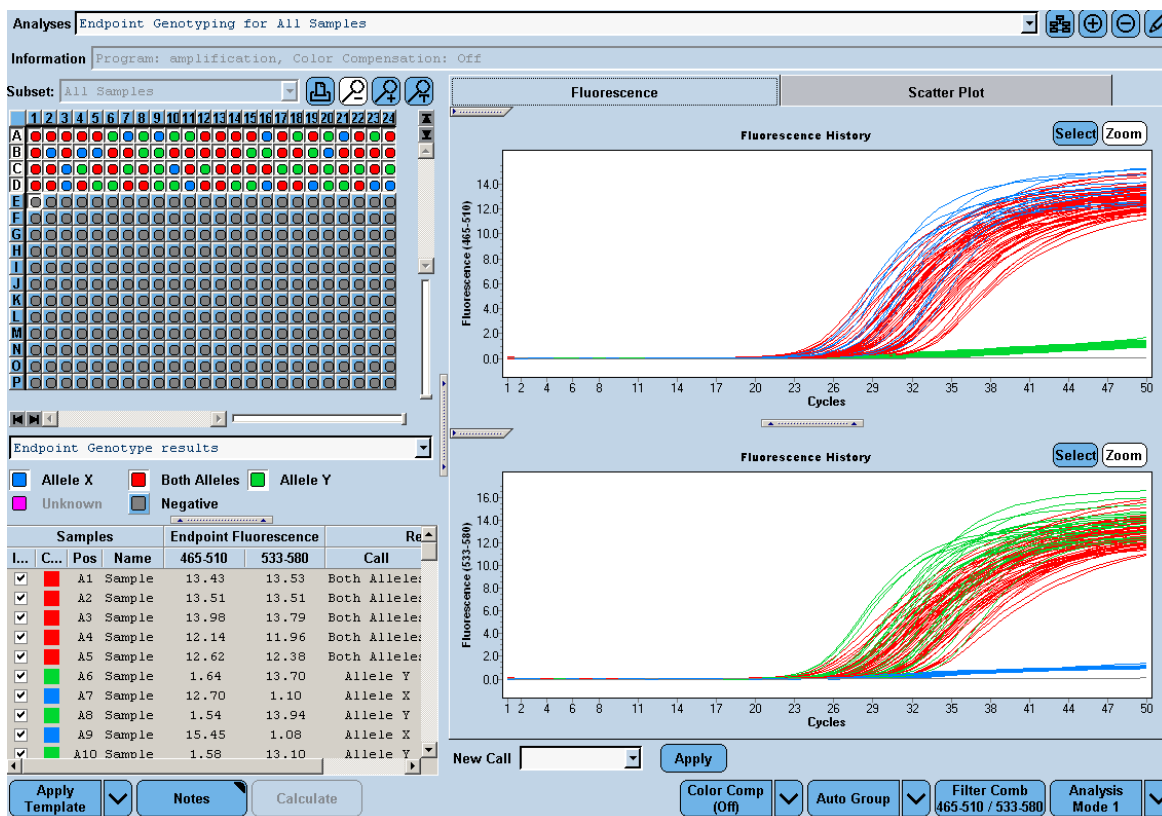
3) heterozigot: porast obeh fluorescenc



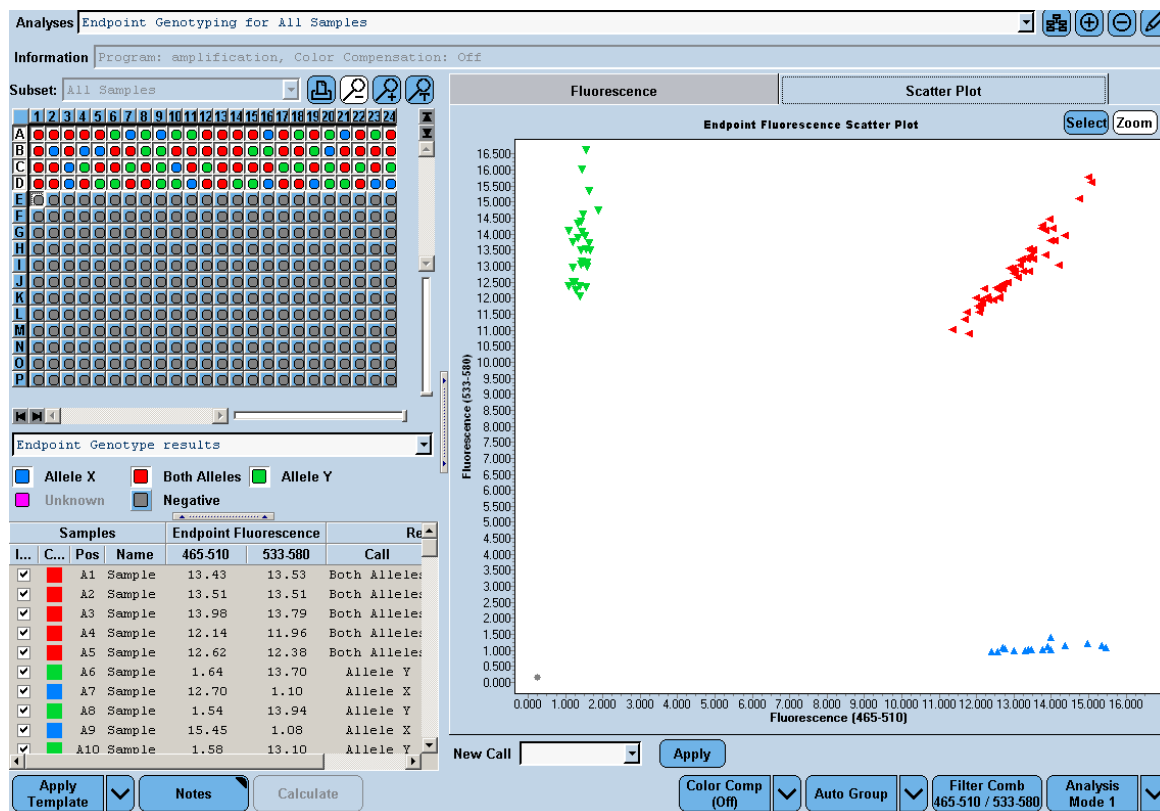
Slika 13: Krivulje fluorescence po končani qPCR reakciji. Odziv dajeta barvili VIC[®] in FAM[®], kar je dokaz za heterozigotno različico na preiskovanem alelu.

V primeru polimorfizma rs2776 oz. 12496C>T je takšen rezultat pomenil prisotnost genotipa CT, pri polimorfizmu rs2301241 oz. -795A>G pa prisotnost genotipa AG.

Na slikah 11, 12 in 13 so prikazane le krivulje fluorescence za vsak posamezen vzorec. Na sliki 14 pa je prikazan končni rezultat analize 96 vzorcev s krivuljami fluorescenc za obe barvili. V mreži (A-D)x(1-24) so homozigoti, kjer dobimo odziv barvila VIC[®], označeni z zeleno piko, homozigoti, kjer dobimo odziv barvila FAM[®], pa z modro. Heterozigoti so označeni z rdečo piko. Na sliki 15 so rezultati analize istih vzorcev predstavljeni še v obliki grafa razpršenosti. Siva pika pri slepem vzorcu E1 predstavlja odsotnost fluorescence.



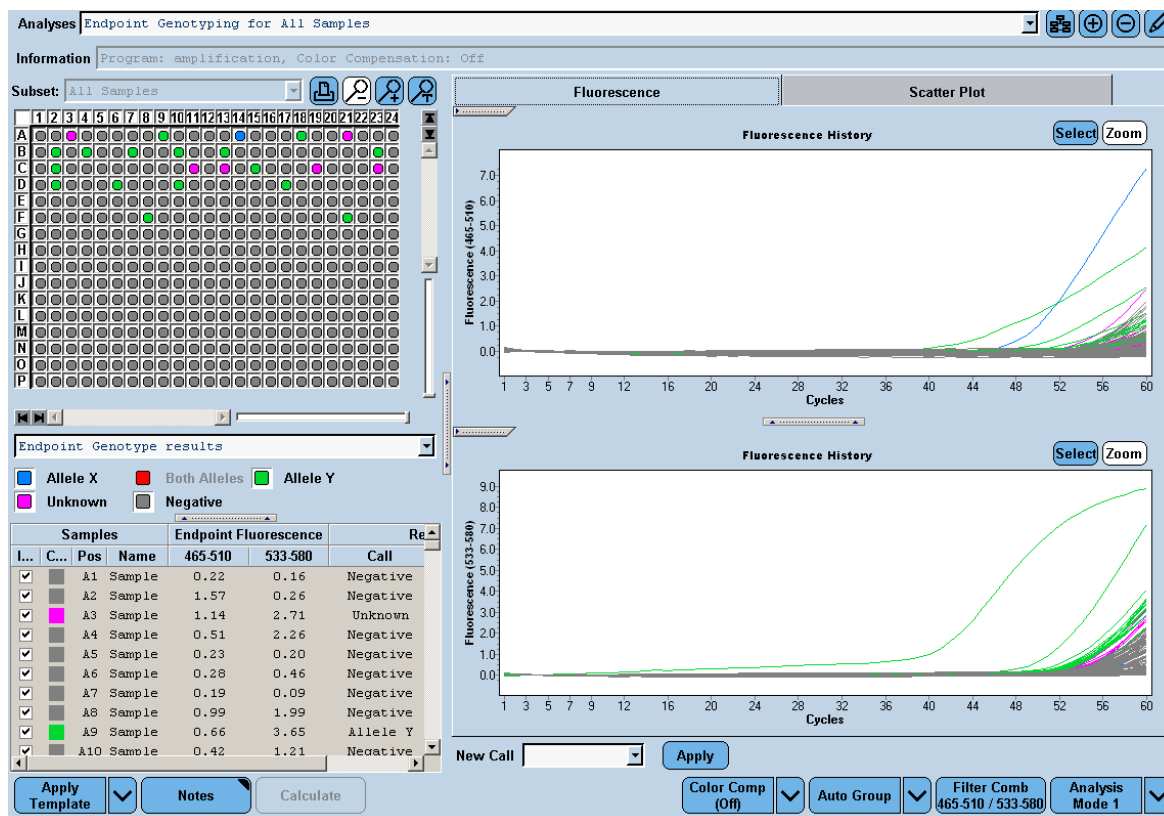
Slika 14: Končni rezultat alelne diskriminacije, dobljen s qPCR reakcijo - prikaz krivulj fluorescence.



Slika 15: Končni rezultat alelne diskriminacije, dobljen s qPCR reakcijo - graf razpršenosti.

4.1.1 Težave, s katerimi smo se srečali pri alelni diskriminaciji

Preden smo dobili tako dobre rezultate, kot jih prikazujeta sliki 14 in 15, smo imeli kar nekaj težav. Pri sondi C__3194436_10 za genotipizacijo polimorfizma 12496C>T (rs2776) včasih sploh nismo dobili fluorescentnega odziva, ali pa so se krivulje pojavile šele proti koncu - po štiridesetem ciklu qPCR reakcije. Primer rezultata takšne analize prikazuje slika 16.



Slika 16: Končni rezultat genotipizacije pri neuspelem poskusu. Vsa siva polja v vrsticah A - F pomenijo, da nismo detektirali pomnoženih PCR produktov. Le nekaj polj je obarvanih, a je do pomnoževanja oz. detekcije prišlo zelo pozno. Vijolična barva pomeni, da program ne more zagotovo določiti pravega genotipa. Dodali smo še 10 ciklov, skupno je poteklo torej 60 ciklov.

Ker smo podobne rezultate dobili tudi pri ponovnem poskusu z isto sondo na istih vzorcih ter tudi pri poskusih na drugih vzorcih, kjer smo s sondo za drug preiskovani polimorfizem -795A>G dobili dobre rezultate, smo naredili teste z istimi vzorci, a s tremi različnimi sondami C__3194436_10 (sonde z drugačnimi serijskimi številkami). Tako smo ugotovili, da dve seriji sond ne delujeta, z eno pa smo dobili lepe rezultate. Z opisom

protokola in poteka poiskusov ter predložitvijo slik z rezultati smo od dobavitelja sond dobili odgovor z uspešno rešeno reklamacijo sond.

4.2 Pregled značilnosti preiskovane populacije

V raziskavo je bilo vključenih 213 preiskovank (nosečnic/mater) iz Hrvaške in 610 novorojenčkov iz Hrvaške in Slovenije. Analizirana populacija je vključena v del študije iz projekta PHIME (»*Public Health Impact of Long-term, Low-level Mixed Element Exposure in Susceptible Population Strata*«), ki pri nosečnicah in otrocih iz različnih evropskih držav ocenjuje vpliv dolgotrajne izpostavljenosti toksičnim kovinam v nizkih odmerkih.

Preglednica XVII v poglavju 7. Priloge pregledno predstavlja značilnosti nosečnic iz Hrvaške. Nosečnice smo razdelili v tri starostne skupine: < 30 let, 30 - 35 let in > 35 let, glede na ITM pred nosečnostjo pa v skupine < 18,5 kg/m² (podhranjenost), 18,5 - 24,9 kg/m² (normalna telesna masa) in > 24,9 kg/m² (prekomerna telesna masa). Glede na kadilski status smo nosečnice razdelili v 5 razredov: nekadilke, kadilke, bivše kadilke (kadile so 1 - 5 let), bivše kadilke (kadile so 6 - 10 let) in bivše kadilke (kadile so več kot 10 let). Podatki zajemajo še pregled pogostnosti uživanja rib, koncentracije različnih tipov PUFA v serumu nosečnic ter koncentracije Hg²⁺ in MeHg v preiskovanih vzorcih telesnih tekočin in las. Za hrvaške novorojenčke so navedene vrednosti Hg²⁺ v urinu.

Prelednica XVIII (glej poglavje 7. Priloge) povzema koncentracije Hg²⁺ in MeHg, izmerjene pri materah slovenskih otrok.

Preglednica XIX (glej poglavje 7. Priloge) predstavlja pogostost posameznih genotipov preučevanih polimorfizmov ločeno glede na nosečnice in novorojenčke. Pridobljene frekvence za vse otroke smo vstavili v Hardy-Weinbergovo enačbo (HWE), s katero smo preverili, ali so ugotovljeni rezultati skladni s populacijskim ravnotežjem alelov in genotipov, ki ostaja konstantno, če niso prisotni nenaključno parjenje, nenaključne mutacije, imigracije in emigracije populacije, nenaključna selekcija (ne sme biti selekcijske preference za kateri koli genotip ali proti kateremu koli genotipu). Predpostavlja neskončno veliko populacijo in odsotnost mutacij.

HWE je sledeča enačba: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, pri čemer so členi kvadratne enačbe frekvence posameznega genotipa: frekvenca (AA) = p^2 ,

$$\text{frekvenca (Aa)} = 2pq,$$

$$\text{frekvenca (aa)} = q^2. \quad (45)$$

S pomočjo kalkulatorja za računanje s HWE na spletu (Online Encyclopedia for Genetic

Epidemiology studies) smo dobili naslednje rezultate:

- izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja vseh novorojenčkov za polimorfizem 12496C>T (rs2776):

$$\left. \begin{array}{l} N(CC) = 176 \\ N(CT) = 294 \\ N(TT) = 139 \end{array} \right\} \text{Primerjava pričakovanih in opazovanih frekvenc je predstavljena v preglednici VI. Podatke uparabimo pri } X^2 \text{ testu.}$$

Preglednica VI: Pričakovane in opazovane frekvence genotipov polimorfizma 12496C>T.

| Genotip | Pričakovana frekvenca | Opazovana frekvenca |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Nemutirani homozigoti | 171,31 | 176 |
| Heterozigoti | 303,38 | 294 |
| Mutirani homozigoti | 134,31 | 139 |

$X^2 = 0,58$ ($N_{\text{tot}}=609$), $p = 0,53$, $q = 0,47$. Eksperimentalna p vrednost, ki je merilo signifikantnosti, je 0,747. (46, 47)

- izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja vseh novorojenčkov za polimorfizem - 795A>G (rs2301241):

$$\left. \begin{array}{l} N(AA) = 178 \\ N(AG) = 312 \\ N(GG) = 119 \end{array} \right\} \text{Primerjava pričakovanih in opazovanih frekvenc je predstavljena v preglednici VII. Podatke uparabimo pri } X^2 \text{ testu.}$$

Preglednica VII: Pričakovane in opazovane frekvence genotipov polimorfizma -795A>G.

| Genotip | Pričakovana frekvenca | Opazovana frekvenca |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Nemutirani homozigoti | 183,18 | 178 |
| Heterozigoti | 301,64 | 312 |
| Mutirani homozigoti | 124,18 | 119 |

$X^2 = 0,72$ ($N_{\text{tot}}=609$), $p = 0,55$, $q = 0,45$. Eksperimentalna p vrednost, ki je merilo signifikantnosti, je 0,698. (46, 47)

Test hi-kvadrat oz. X^2 nam pove, ali se eksperimentalno ugotovljene frekvence razlikujejo od pričakovanih populacijskih frekvenc. Ker je pri obeh testih eksperimentalna p vrednost večja od 0,05, ne moremo govoriti o statistično značilnih razlikah med dobljenimi in pričakovanimi frekvencami in lahko zaključimo, da je preiskovana populacija otrok za oba polimorfizma v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Glede na pogostnost določenega genotipa pri izbranih preiskovanih polimorfizmih se dobljen rezultat glede na geografsko različne populacije kar dobro ujema s pogostnostmi pri Evropejcih. (48, 49). V preglednici VIII so predstavljene frekvence genotipov iz dosedaj opravljenih raziskav.

Preglednica VIII: Pogostnost posameznih genotipov pri 12496C>T (rs2776) in -795A>G (rs2301241) v odstotkih.

| Etnična skupina | 12496C>T (rs2776) | | | -795A>G (rs2301241) | | |
|---|-------------------|------|------|---------------------|------|------|
| | CC | CT | TT | AA | AG | GG |
| Slovenci in Hrvati (n=609; naša študija) | 28,9 | 48,3 | 22,8 | 29,2 | 51,2 | 19,5 |
| Evropejci (n = 226) | 21,2 | 52,2 | 26,5 | 33,6 | 50,4 | 15,9 |
| Evropejci (n = 120) | 13,3 | 60,0 | 26,7 | 35,0 | 51,7 | 13,3 |
| Azijci (n = 86) | 86,0 | 14,0 | - | 55,8 | 37,2 | 7,0 |
| Azijci (n = 90) | 86,7 | 13,3 | - | 55,6 | 37,8 | 6,7 |
| Azijci (n = 172) | 90,7 | 9,3 | - | 57,0 | 34,9 | 8,1 |
| Sub-Saharski Afričani (n = 226) | 20,4 | 56,6 | 23,0 | 24,8 | 46,9 | 28,3 |
| Afro-Američani (n = 124) | 24,2 | 53,2 | 22,6 | 25,8 | 48,4 | 25,8 |

V preglednici XX (glej 7. Priloge) so rezultati genotipizacije novorojenčkov iz Slovenije, v preglednici XXI v istem poglavju pa rezultati genotipizacije nosečnic in novorojenčkov iz Hrvaške.

4.3 Obdelava rezultatov s statističnimi testi

4.3.1 Testiranje povezanosti polimorfizma 12496C>T s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v laseh, krvi, urinu in mleku hrvaških mater ter popkovnični krvi

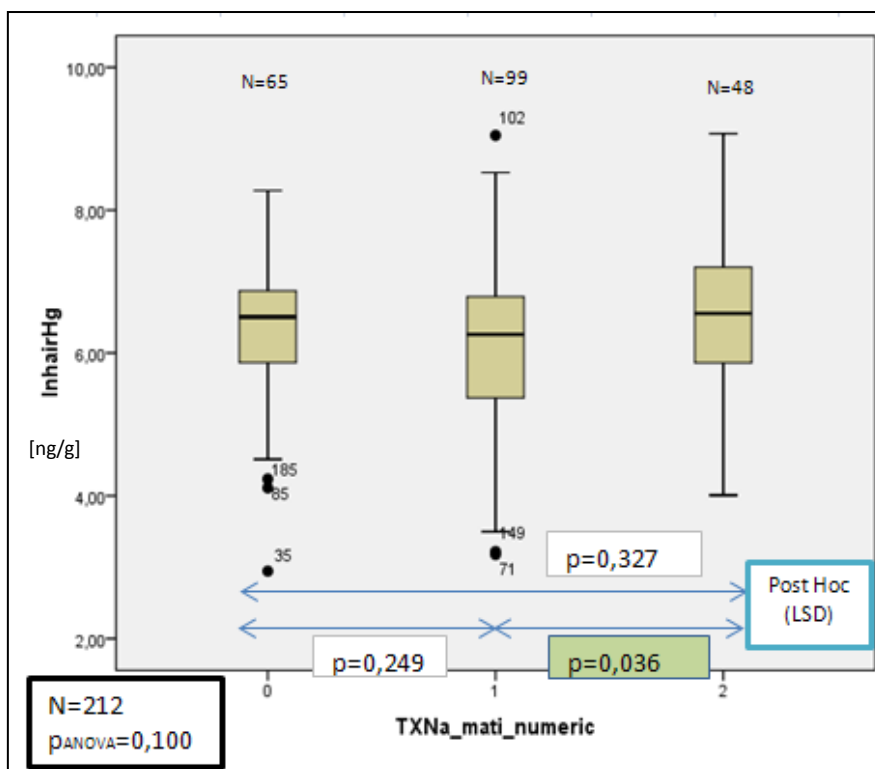
Polimorfizem 12496C>T (rs2776) je prvi od obeh preučevanih tag polimorfizmov v genu *TRX*. Zanimalo nas je, ali tri različne genotipske različice tega polimorfizma povzročijo statistično značilno razliko v koncentracijah Hg²⁺ in MeHg v omenjenih bioloških vzorcih. Najprej smo preverili normalnost porazdelitve koncentracij Hg²⁺ in MeHg z neparametričnim testom Kolmogorov-Smirnov. Pri koncentracijah, ki so se v populaciji hrvaških mater porazdeljevale (logaritemsko) normalno, smo nadaljevali s testom ANOVA, pri nenormalno porazdeljenih koncentracijah pa z neparametričnim testom Kruskal-Wallis (v tabelah označen kot K-W test).

Ničelna hipoteza pri testih se je glasila: preučevani polimorfizem ni povezan s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v vzorcih krvi, las, urina, mleka mater in popkovnične krvi, kar pomeni, da so povprečne vrednosti koncentracij med genotipskimi skupinami enake. Alternativna hipoteza je bila, da je polimorfizem povezan z omenjenimi koncentracijami Hg²⁺ in MeHg pri materah. S testom ANOVA smo primerjali srednje vrednosti med tremi genotipskimi skupinami. Rezultat testa pove vrednost p, ki je merilo signifikantnosti. Vrednosti p, ki so manjše od 0,05, dokazujejo statistično značilne razlike med genotipskimi skupinami. Rezultati testiranja ANOVA so povzeti v preglednici IX.

Preglednica IX: Povzetek rezultatov testov ANOVA za polimorfizem 12496C>T pri hrvaških materah

| rs2776 oz. 12496C>T | one way ANOVA | | LSD | | |
|---------------------|---------------|-----|-------|-------|--------------|
| | p | N | CC-CT | CC-TT | CT-TT |
| lnhHg | 0,100 | 212 | 0,249 | 0,327 | 0,036 |
| lnhMeHg | 0,161 | 44 | | | |
| lnmHg | 0,076 | 211 | 0,273 | 0,242 | 0,025 |
| mMeHg | 0,717 | 48 | | | |
| lncordHg | 0,032 | 196 | 0,294 | 0,120 | 0,009 |
| lncordMeHg | 0,511 | 44 | | | |
| lnmilkHg | 0,392 | 112 | | | |
| muHg (K-W test) | 0,738 | 210 | | | |

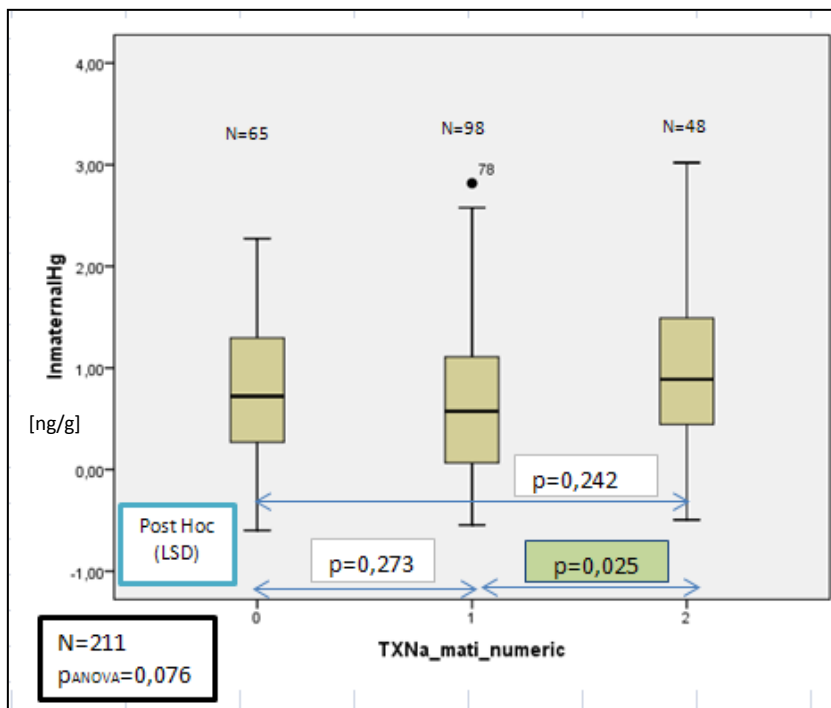
Iz preglednice IX je razvidno, da v primeru koncentracij Hg^{2+} v popkovnični krvi (cordHg) lahko zavržemo ničelno hipotezo. Ugotovili smo, da je genotip polimorfizma 12496C>T pri hrvaških materah povezan s koncentracijami Hg^{2+} v popkovnični krvi. Vrednosti p, ki so bile med 0,05 in 0,1, smo obravnavali kot mejno signifikantne in tudi pri njih, tako kot pri statistično značilnih, v kasnejših testih upoštevali še vpliv kovariat. Da bi pri testu ANOVA odkrili, med katerimi pari genotipskih skupin obstaja značilna razlika v srednjih vrednostih koncentracij Hg^{2+} , smo naredili še LSD Post Hoc test. Rezultate testov, ki so pokazali statistično različne vrednosti med genotipskimi skupinami, smo grafično prikazali v obliki diagramov »škatele z ročaji« na slikah 17, 18 in 19.



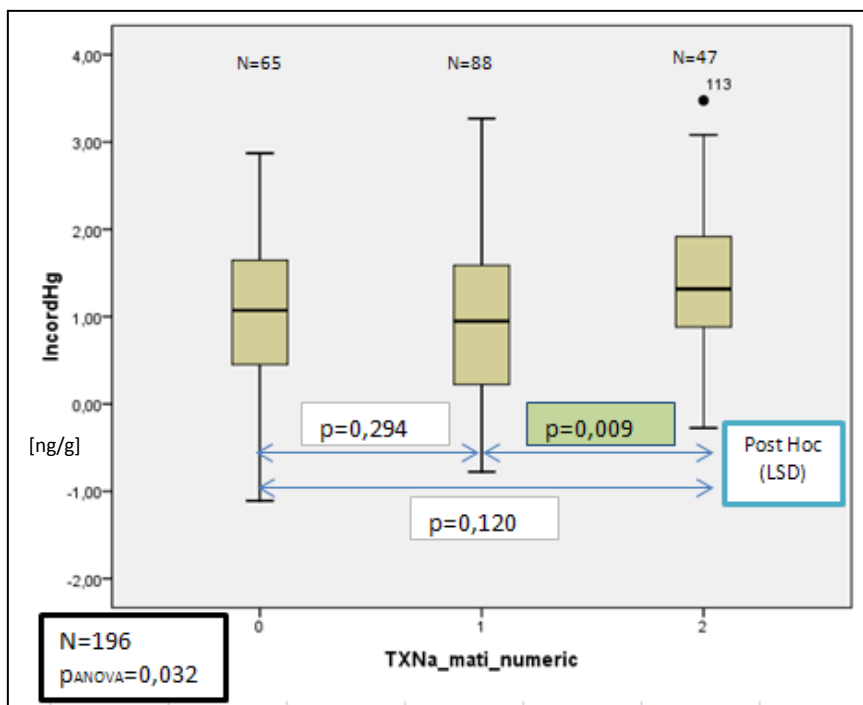
Slika 17: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti koncentracij Hg^{2+} v lasih hrvaških mater (hHg) med genotipi 0 (CC), 1 (CT) in 2 (TT) ter p vrednost testa ANOVA ter LSD Post Hoc testa.

Glede na LSD Post Hoc test smo pokazali, da se med seboj značilno razlikujejo koncentracije Hg^{2+} v lasih mater z genotipoma CT in TT, pri čemer imajo matere z genotipom TT značilno višje vrednosti Hg^{2+} v lasih. Podoben zaključek sledi tudi za koncentracije Hg^{2+} v materini in popkovnični krvi, saj se tudi pri teh statistično značilno razlikujeta genotipski skupini CT in TT, spet z najvišjimi vrednostmi Hg^{2+} pri materah z

genotipom TT. To potrjujejo tudi povprečne koncentracije pri posameznem genotipu, prikazane v tabeli XXII v poglavju 7. Priloge.



Slika 18: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti koncentracij Hg^{2+} v krvi hrvaških mater (mHg) med genotipi 0 (CC), 1 (CT) in 2 (TT) ter p vrednost testa ANOVA ter LSD Post Hoc testa.



Slika 19: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti koncentracij Hg^{2+} v popkovnični krvi hrvaških mater (cordHg) med genotipi 0 (CC), 1 (CT) in 2 (TT) ter p vrednost testa ANOVA ter LSD Post Hoc testa.

4.3.1.1 Vključitev kovariat pri testiranju povezanosti polimorfizma 12496C>T s koncentracijami Hg²⁺ v laseh in krvi hrvaških mater ter popkovnični krvi

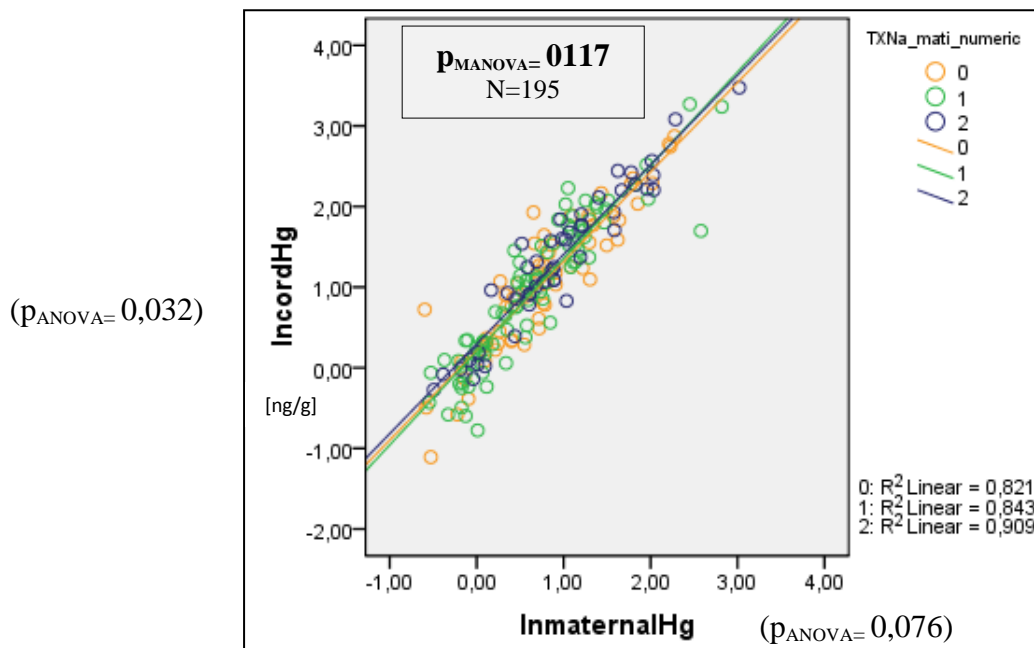
Kjer smo pri testiranjih ANOVA dobili statistično značilne povezave, smo v nadaljnjem testu ANCOVA upoštevali še dejstvo, da na signifikantnost, ki jo pokažejo testi ANOVA, lahko vplivajo tudi različne kovariate. S testi ANCOVA izključimo vpliv kovariat in preverimo, ali še vedno obstaja statistično značilna razlika med genotipskimi podskupinami. Predpogoj, da lahko za določeno kovariato trdimo, da ima skupaj z genotipom vpliv na razlike v koncentracijah Hg²⁺ med genotipskimi podskupinami je, da preverimo homogenost naklona regresijske premice, ki prikazuje korelacijo med posamezno kovariato in odvisno spremenljivko (koncentracijo Hg²⁺). Rezultati (p vrednosti) testov so povzeti v preglednici XXIV v poglavju 7. Priloge. V preglednici smo značilne korelacije označili z znakom *.

Iz preglednice XXIV je razvidno, da naslednje kovariate skupaj z genotipom značilno vplivajo na koncentracije Hg²⁺ v laseh, krvi in popkovnični krvi pri hrvaških materah:

- Na Hg²⁺ v laseh in Hg²⁺ v materini krvi: statistično značilen sovpliv Mn, Se in Pb v popkovnični krvi ter kombinacij Mn in Se ter Mn in Zn v popkovnični krvi
- Na Hg²⁺ v popkovnični krvi: statistično značilen sovpliv Se in As v materini krvi, Mn, Cu, Se, Zn in Pb v popkovnični krvi in sovpliv starosti matere. Sovplivajo tudi kombinacije Mn in Se v materini krvi ter Mn, Se in Zn v popkovnični krvi.

4.3.1.2 Ocena razporeditve Hg²⁺ med materino in popkovnično krvjo glede na genotip polimorfizma 12496C>T pri hrvaških materah

Želeli smo preveriti, ali genotip polimorfizma 12496C>T pri materi različno vpliva na razporeditev Hg²⁺ med krvjo matere in popkovnično krvjo. S testom MANOVA smo dobili rezultat, ki je prikazan na sliki 20. Iz vrednosti $p=0,117$ je razvidno, da pri različnih genotipih, ki imajo sicer značilen vpliv na koncentracije Hg²⁺ v popkovnični in mejno značilen vpliv na koncentracije Hg²⁺ v materini krvi, ni značilnega vpliva na razporeditev Hg²⁺ med materino in popkovnično krvjo. Med popkovničnimi in krvnimi koncentracijami Hg²⁺ pa po pričakovanjih obstaja značilna korelacija za vsak posamezen genotip.



Slika 20: Graf razporeditve Hg^{2+} med materino in popkovnično krvjo glede na genotip polimorfizma 12496C>T pri hrvaških materah.

4.3.2 Testiranje povezanosti polimorfizma -795A>G s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v laseh, krvi, urinu in mleku hrvaških mater ter popkovnični krvi

Tudi za drug polimorfizem smo naredili teste ANOVA, da bi preverili vpliv genotipa na preiskovane koncentracije Hg^{2+} in MeHg v omenjenih bioloških vzorcih. Pri tem polimorfizmu ni vidnih značilnih povezav, kar je razvidno iz preglednice X. Nobena p vrednost ni manjša od 0,05.

Preglednica X: Povzetek rezultatov testov ANOVA za polimorfizem -795A>G pri hrvaških materah

| rs2301241 oz. -795A>G | one way ANOVA | |
|-----------------------|---------------|-----|
| | P | N |
| CRO MAME | | |
| lnhHg | 0,791 | 212 |
| lnhMeHg | 0,256 | 44 |
| lnmHg | 0,991 | 211 |
| mMeHg | 0,816 | 48 |
| lncordHg | 0,770 | 196 |
| lncordMeHg | 0,970 | 44 |
| lnmilkHg | 0,928 | 112 |
| muHg (K-W test) | 0,936 | 210 |

4.3.3 Testiranje povezanosti kombinacije genotipov polimorfizmov 12496C>T in -795A>G pri hrvaških materah s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v laseh, krvi in mleku hrvaških mater ter popkovnični krvi

Z dvosmerno anovo smo za kombinacijo genotipov obeh polimorfizmov pri hrvaških materah testirali povezanost enakih parametrov, kot pri vsakem genotipu posebej. Neodvisna spremenljivka je bila v tem primeru kombinacija genotipov obeh polimorfizmov, določenih pri vsaki materi. Rezultati v preglednici XI ne prikazujejo značilnih povezav.

Preglednica XI: Povzetek rezultatov dvosmernih testov ANOVA za kombinacijo polimorfizmov 12496C>T in -795A>G pri hrvaških materah

| 12496C>T*-795A>G | two way ANOVA | |
|------------------|---------------|-----|
| CRO MAME | P | N |
| lnhHg | 0,208 | 212 |
| lnhMeHg | 0,664 | 44 |
| lnmHg | 0,210 | 211 |
| mMeHg | 0,768 | 48 |
| lncordHg | 0,278 | 196 |
| lncordMeHg | 0,926 | 44 |
| lnmilkHg | 0,713 | 112 |

4.3.4 Testiranje povezanosti preučevanih polimorfizmov pri hrvaških otrocih s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ter s koncentracijami Hg^{2+} v urinu otrok

Ker je popkovnična kri zaradi težavnega razlikovanja med vensko (materino) in arterijsko (zarodkovo) krvjo pri odvzemu skupna oz. mešana kri matere in otroka, lahko poleg genotipa matere na koncentracije Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi vpliva tudi genotip otroka. S testom ANOVA smo preverili morebitno povezanost najprej ločeno za vsak preučevani polimorfizem, nato pa še z dvosmerno ANOVO za kombinacijo obeh polimorfizmov. Rezultate prikazuje preglednica XII.

Preglednica XII: Povzetek rezultatov testov ANOVA za posamezen preučevani polimorfizem in dvosmernih testov ANOVA za kombinacijo polimorfizmov 12496C>T in -795A>G pri hrvaških otrocih

| 12496C>T | p | N |
|-------------------------------|-------|-----|
| lncordHg | 0,824 | 159 |
| lncordMeHg | 0,912 | 36 |
| buHg (K-W test) | 0,961 | 102 |
| -795A>G | p | N |
| lncordHg | 0,856 | 159 |
| lncordMeHg | 0,343 | 36 |
| buHg (K-W test) | 0,873 | 102 |
| 12496C>T*-795A>G | p | N |
| lncordHg | 0,208 | 159 |
| lncordMeHg | 0,654 | 36 |

Noben test ni pokazal statistično značilnih povezav.

Glede na to, da smo pri materah dokazali značilno povezanost med polimorfizmom 12496C>T in koncentracijami Hg^{2+} v popkovnični krvi, pri otrocih pa ne, lahko zaključimo, da je genotip mame v tem primeru boljši biomarker in da ima večji vpliv na koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi, kot genotip otroka. Določanje **genotipa polimorfizma 12496C>T pri materah ima torej večjo napovedno vrednost.**

Vsekakor bi bilo potrebno še dodatno testirati povezanost s koncentracijami MeHg, saj smo imeli v raziskavi premajhno število podatkov (koncentracije MeHg so bile izmerjene le pri 36 vzorcih) in s tem premajhno statistično moč testiranja, da bi lahko naredili trdne zaključke.

4.3.5 Testiranje povezanosti kombinacije genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka (po parih) s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi

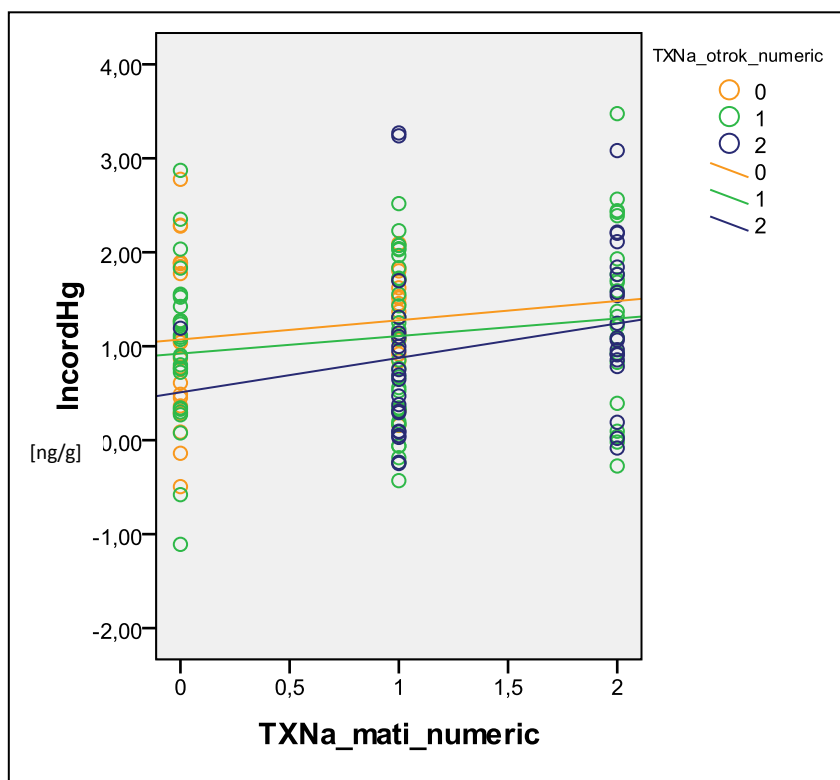
Z dvosmerno ANOVO smo preverili sovpliv genotipov polimorfizma 12496C>T matere in njenega otroka na koncentracije Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi, ki je mešanica venske krvi matere in arterijske krvi zarodka. Rezultate testov povzema preglednica XIII.

Preglednica XIII: Povzetek rezultatov dvosmernih testov ANOVA za kombinacijo genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka

| 12496C>T(mati)*12496C>T(otrok) | two way ANOVA | |
|--------------------------------|---------------|-----|
| | P | N |
| IncordHg | 0,891 | 159 |
| IncordMeHg | 0,763 | 36 |

Iz preglednice razberemo, da skupen vpliv genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka ni statistično značilen. Statistično moč testa bi povečali z večjim številom podatkov o koncentracijah MeHg v popkovni krvi, kjer smo imeli na voljo le 36 podatkov.

Preverili smo tudi, kako kombinacija genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka vpliva na koncentracijo Hg^{2+} v popkovnični krvi. Rezultat testa predstavlja graf na sliki 21.



Slika 21: Graf odvisnosti koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi od kombinacije genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka (0-CC, 1-CT, 2-TT).

Iz grafa lahko razberemo naslednje:

- če je mati nosilka genotipa CC in otrok genotipa CC, so koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi višje, kot če je otrok nosilec genotipa CT;

- če je mati nosilka genotipa TT, so koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi najvišje, ne glede na genotip otroka;
- pri materah z genotipom CT so koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi najvišje, če je otrok nosilec genotipa CC, sledi genotipa CT, najnižje pa so pri genotipu otroka TT.

Pomemben je tudi naklon linij posameznega genotipa, ki je najbolj strm za genotip TT. To pomeni, da je značilna kumulativna vrednost vpliva genotipa matere v kombinaciji obeh pri TT najvišja in najbolj vpliva na porast koncentracij Hg^{2+} v popkovnični krvi.

Iz preglednic XXII in XXIII v poglavju 7. Priloge razberemo, da so najvišje povprečne vrednosti koncentracij Hg^{2+} v popkovnični krvi (cordHg) značilne za genotip TT tako pri materah kot pri otrocih. Sklepamo lahko, da **genotip 12496TT predstavlja rizični faktor in je potencialni biološki marker za napovedovanje izpostavljenosti ploda živemu srebru preko popkovnične krvi.**

4.3.6 Testiranje povezanosti kombinacije genotipov polimorfizma -795A>G matere in otroka (po parih) s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi

Z dvosmerno ANOVO smo preverili skupen vpliv genotipov polimorfizma -795A>G matere in njenega otroka na koncentracije Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi, ki je mešanica venske krvi matere in arterijske krvi zarodka. Rezultate testov povzema preglednica XIV.

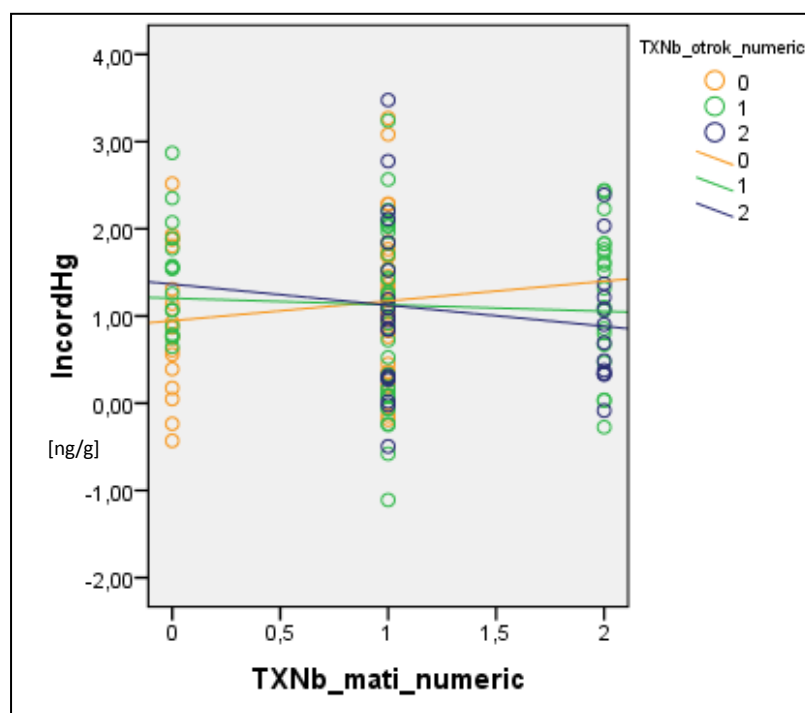
Preglednica XIV: Povzetek rezultatov dvosmernih testov ANOVA za kombinacijo genotipov polimorfizma 12496C>T matere in otroka

| -795A>G(mati)*-795A>G(otrok) | two way ANOVA | |
|------------------------------|---------------|-----|
| | P | N |
| lncordHg | 0,057 | 159 |
| lncordMeHg | 0,952 | 36 |

Ker je vrednost pri koncentraciji Hg^{2+} v popkovnični krvi (lncordHg) blizu meje signifikantnosti, smo naredili dodatne teste z vpeljavo kovariat. Rezultati so povzeti v preglednici XXV v poglavju 7. Priloge. Iz posameznih p vrednosti v preglednici je

razvidno, da naslednje kovariate skupaj s kombinacijo genotipov polimorfizma -795A>G značilno vplivajo na koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi: koncentracije As in Se v materini krvi ter Mn, Cu, Zn in Se v popkovnični krvi. Vplivajo tudi kombinacije kovariat, in sicer koncentracije Mn, Se in Zn v popkovnični krvi ter Mn in Se v materini krvi, poleg tega pa tudi kombinacija kadilskega statusa in starosti matere. Z izključitvijo omenjenih kovariat postane vpliv kombinacije polimorfizma statistično značilen.

Spet smo preverili, kako kombinacija genotipov polimorfizma -795A>G matere in otroka vpliva na koncentracijo Hg^{2+} v popkovnični krvi. Rezultat testa predstavlja graf na sliki 22.



Slika 22: Graf odvisnosti koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi od kombinacije genotipov polimorfizma -795A>G matere in otroka (0-AA, 1-AG, 2-GG).

Iz grafa lahko razberemo naslednje:

- če je mati nosilka genotipa AA in otrok genotipa AA, so koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi nižje, kot če je otrok nosilec genotipa AG.
- če je mati nosilka genotipa GG in otrok genotipa GG, so koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi nižje, kot če je otrok nosilec genotipa AG.
- pri materah z genotipom AG so koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi najvišje, neodvisno od genotipa otroka. Znotraj podskupine pa so sicer najvišje koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi, če je otrok matere z genotipom AG nosilec genotipa AA, sledi genotip otroka AG, najnižje pa so pri genotipu otroka GG.

Iz tega sklepamo dvoje:

- da so najnižje koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi matere takrat, ko stamati in otrok nosilca enakega homozigotnega genotipa polimorfizma -795A>G,
- da je materin genotip -795AG rizični faktor za višje koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi in je potencialni biološki marker, ki ima za posledico večjo izpostavljenost ploda živemu srebru.

Drugi sklep lahko dodatno podkrepimo s podatkom iz preglednice XXII. Gre za povprečno vrednost $c(\text{Hg}^{2+})$ v popkovnični krvi (cordHg), ki je najvišja pri materah z genotipom AG. Da bi naš sklep podkrepili, bi bilo potrebno testiranje opraviti na večjem številu vzorcev. Predvsem je problematično število mutiranih homozigotov, ki znaša pri polimorfizmu -795A>G za matere 43 in za otroke 34 (glej preglednico XIX v poglavju 7. Priloge).

4.3.7 Testiranje povezanosti genotipov preučevanih polimorfizmov pri slovenskih otrocih s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi

Ker poleg DNK slovenskih otrok nismo vzporedno preučevali tudi DNK njihovih mater, smo lahko genotipe slovenskih otrok povezali le s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi. Število testov je za skupino slovenskih otrok posledično manjše.

S testom ANOVA smo preverili morebitno povezanost s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi najprej ločeno za vsak preučevani polimorfizem, nato pa še z dvosmerno ANOVO za kombinacijo obeh polimorfizmov. Rezultate prikazuje preglednica XV.

Preglednica XV: Povzetek rezultatov testov ANOVA za posamezen preučevani polimorfizem in dvosmernih testov ANOVA za kombinacijo polimorfizmov 12496C>T in -795A>G pri slovenskih otrocih

| | | |
|-------------------------------|-------|-----|
| 12496C>T | p | N |
| lncordHg | 0,371 | 423 |
| lncordMeHg | 0,461 | 14 |
| -795A>G | p | N |
| lncordHg | 0,811 | 423 |
| lncordMeHg | 0,131 | 14 |
| 12496C>T*-795A>G | p | N |
| lncordHg | 0,342 | 422 |
| lncordMeHg | 0,479 | 14 |

Vsi testi so pokazali, da med genotipi slovenskih otrok in izmerjenimi koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ni značilnih povezav.

4.3.8 Testiranje povezanosti preučevanih polimorfizmov pri združeni populaciji slovenskih in hrvaških otrok s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi

Namen testa je bil povečati število preučevanih vzorcev, ki jih vključimo v testiranje in tako povečati statistično moč testov. Združili smo populaciji slovenskih (N=431) in hrvaških (N= 179) otrok, ter s testom ANOVA najprej preverili, ali obstaja povezava med koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ter genotipom otroka za vsak preučevan polimorfizem posebej. Z dvosmerno ANOVO smo nato testirali še kombinacijo obeh preučevanih polimorfizmov. Rezultati so povzeti v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Povzetek rezultatov testov ANOVA za posamezen preučevani polimorfizem in dvosmernih testov ANOVA za kombinacijo polimorfizmov 12496C>T in -795A>G pri združeni populaciji slovenskih in hrvaških otrok.

| | | |
|-------------------------------|-------|-----|
| 12496C>T | p | N |
| lncordHg | 0,602 | 582 |
| lncordMeHg | 0,635 | 50 |
| -795A>G | p | N |
| lncordHg | 0,920 | 582 |
| lncordMeHg | 0,499 | 50 |
| 12496C>T*-795A>G | p | N |
| lncordHg | 0,294 | 581 |
| lncordMeHg | 0,681 | 50 |

Iz rezultatov testa je razvidno, da pri združeni populaciji otrok nismo odkrili značilnih povezav.

5. SKLEP

Raziskavo v sklopu diplomskega dela zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- Polimorfizem 12496C>T pri hrvaških materah je mejno značilno povezan s povprečnimi koncentracijami Hg^{2+} v vzorcih las in venske krvi, pri čemer smo obakrat ugotovili značilno višje koncentracije Hg^{2+} pri preiskovankah z genotipom TT od preiskovank z genotipom CT.
- Polimorfizem 12496C>T pri hrvaških materah je značilno povezan s povprečnimi koncentracijami Hg^{2+} v popkovnični krvi, kjer imajo po pričakovanju najvišje koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi novorojenčki mater z genotipom TT, in sicer spet značilno višje kot novorojenčki preiskovank z genotipom CT.
- Materin genotip polimorfizma 12496C>T nima značilnega vpliva na porazdelitev Hg^{2+} med materino in popkovnično krvjo in otrokov genotip polimorfizma 12496C>T nima vpliva na koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi.
- Kombinacija genotipov polimorfizma -795A>G pri testiranju hrvaških parov mati - otrok je z upoštevanjem kovariat značilno povezana s koncentracijami Hg^{2+} v popkovnični krvi. Največji vpliv na visoke koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi ima genotip -795AG pri materi, ne glede na genotip otroka.
- Ker je plod znotraj placente zavarovan pred direktno izpostavljenostjo živemu srebru, je celokupna izpostavljenost ploda živemu srebru nižja kot pri materi in se zato vpliv genotipa otroka še ne more izraziti. To smo dokazali z našimi rezultati tudi za populacijo slovenskih otrok, pri kateri ni noben preučevani polimorfizem niti kombinacija obeh značilno povezana s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi. Tudi z združitvijo vseh otrok v eno populacijo nismo ugotovili značilnih povezav preučevanih polimorfizmov s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi.

Na podlagi ugotovitev lahko povzamemo, da sta genotipa **12496TT** in **-795AG** matere potencialna biološka markerja in rizična faktorja za višje koncentracije Hg^{2+} v materini krvi in posledično v popkovnični krvi, s tem pa pride do večje izpostavljenosti ploda živemu srebru. **Genotip matere ima torej pri preučevanih polimorfizmih večji vpliv na koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi in močnejšo napovedno vrednost, kakor isti parameter pri otroku.**

Za natančnejše rezultate študij v prihodnosti predlagamo povečanje števila podatkov o koncentracijah MeHg v bioloških vzorcih mater in novorojenčkov, saj gre pri MeHg za pomemben nevrotoksin, ki negativno vpliva na nevrolški razvoj otroka. Pomen polimorfizmov bi nadalje ovrednotili v povezavi z izidom, ki bi bil v primeru naše študije razvoj in nevrolški status otroka. Tako bi ugotovili relativno tveganje in razmerje obetov posameznega genotipa preučevanih polimorfizmov za negativne posledice izpostavljenosti ploda živemu srebru in metilživemu srebru preko popkovnične krvi med nosečnostjo.

Zanimivo bi bilo preučiti, kako izbrana preučevana polimorfizma, ki sta del 3'-UTR regije v genu *TRX*, vplivata na gensko ekspresijo, izrezovanje genskih segmentov in ali se redoks funkcija TRX spremeni glede na posamezen genotip. Drugačno zvijanje proteina bi lahko imelo za posledico različen (slabši oz. boljši) antioksidantni odgovor TRX sistema ob izpostavljenosti Hg^{2+} in MeHg.

6. LITERATURA

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Mercury_%28element%29 (dostopno 25.9.2012)
2. Heron J, Golding J: Thimerosal Exposure in Infants and Developmental Disorders: A Prospective Cohort Study in the United Kingdom Does Not Support a Causal Association, *Pediatrics*, Vol. 114, No. 3, 2004: 577-583
3. Geier DA, Geier MR: A comparative evaluation of the effects of MMR immunization and mercury doses from thimerosal-containing childhood vaccines on the population prevalence of autism, *Med Sci Monit*, Vol. 10, No. 3, 2004: 33-39
4. http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=78&pi=6&_6_id=889&_6_PageIndex=0&_6_groupId=-2&_6_newsCategory=IVZ+kategorija&_6_action=ShowNewsFull&pl=78-6.0 (dostopno 27.9.2012)
5. Horvat M: Mercury as a global pollutant, *Anal Bioanal Chem*, Vol. 374, 2002: 981
6. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 947-948
7. Sanfeliu C, Sebastià J, Cristòfol R, Rodríguez-Farré E: Neurotoxicity of Organomercurial Compounds, *Neurotoxicity research*, Vol. 5, 2003: 286-306
8. Clarkson TW, Mlagos L, Myers GJ: The Toxicology of Mercury - Current Exposures and Clinical Manifestations, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 349, 2003: 1731-1737
9. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 683-709
10. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 948-949
11. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 79-95
12. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 932-936
13. Černe K: Toksikologija (težkih) kovin, *Medicinski razgledi*, Vol. 48, 2009: 83-100
14. Nishinaka Y, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J.: Redox control of cellular function by thioredoxin; a new therapeutic direction in host defence, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 49(4), 2001: 285-292

15. Yorifuji T, Tsuda T, Inoue S, Takao S, Harada M: Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan, *Environment International*, Vol. 37, 2003: 907-913
16. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 529, 543
17. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 599-600
18. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 638, 639, 687
19. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 149
20. Semczuk M, Semczuk-Sikora A: New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb and Hg in particular) and Mg status during pregnancy, *Med Sci Monit*, 7(2), 2001: 332-340
21. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost, *Farmaceutski vestnik*, št. 3, letnik 63, 2012: 153-154
22. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 353-356
23. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N: Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 2001: 529-539
24. Masutani H, Ueda S, Yodoi J: The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis, *Cell death and differentiation*, 12, 2005: 991-998
25. Hansen JM, Zhang H, Jones DP: Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2 and glutathione by metal ions, *Free Radical Biology & Medicine*, 40, 2006: 138-145
26. Carvalho CML, Chew E-H, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A: Inhibition of the Human Thioredoxin System - A molecular mechanism of mercurial toxicity, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, No. 18, 2007: 11913-11923
27. Kumar JK, Tabor S, Richardson CC: Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101, No. 11, 2004: 3759-3764

28. Mukherjee A, Martin SG: The thioredoxin system: a key target in tumour and endothelial cells, *The British Journal of Radiology*, 81, 2008, 57–68
29. Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S: Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69, *Nat Cell Biol*, 4 (10), 2002, 743-749
30. Klaassen CD.: Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 89
31. Nishiyama A, Masutani H, Nakamura H, Nishinaka Y, Yodoi J: Redox Regulation by Thioredoxin and Thioredoxin-Binding Proteins, *IUBMB Life*, 52, 2001: 29–33
32. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TXN> (dostopno 15.10.2012)
33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (dostopno 15.10.2012)
34. http://en.wikipedia.org/wiki/International_HapMap_Project (dostopno 15.11.2012)
35. <http://www.drpeterjdadamo.com/wiki/wiki.pl/HapMap> (dostopno 15.11.2012)
36. Seibold P, Hein R, Schmezer P, Hall P, Liu J, Dahmen N, Flesch-Janys D, Popanda O, and Chang-Claude J: Polymorphisms in oxidative stress-related genes and postmenopausal breast cancer risk, *International Journal of Cancer*, Vol. 129, No. 6, 2011: 1467-1476
37. Ikegami H, Ono M, Fujisawa T, Hiromine Y, Kawabata Y, Yamato E: Molecular scanning of the gene for thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, and genetic susceptibility to type 1 diabetes, *Ann N Y Acad Sci*, 1150, 2008: 103-105
38. Wen S, Lu W, Zhu H, Yang W, Shaw GM, Lammer EJ, Islam A, Finnell RH: Genetic polymorphisms in the thioredoxin 2 (TXN2) gene and risk for spina bifida, *Am J Med Genet A*, 149A(2), 2009: 155-60
39. Comtois SL, Gidley MD and Kelly DJ: Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*, *Microbiology*, 149, 2003: 121-129
40. Protokol *DNA purification from tissues* iz priročnika *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 3rd Ed., 04/2010: 33-36
41. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR - dostopno na spletni strani http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf (dostopno 21.10.2012)

42. https://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResultLink?offset=0&searchMode=keyword&productTypeSelect=genotyping&targetTypeSelect=snp_all&keyword=rs2776 (dostopno 21.10.2012)
43. https://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResultLink?offset=0&searchMode=keyword&productTypeSelect=genotyping&targetTypeSelect=snp_all&keyword=rs2301241 (dostopno 21.10.2012)
44. Petrie A, Sabin C: Medical Statistics at a Glance, 3rd edition, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2009
45. Tracey M: Genetic Equilibrium, Encyclopedia of Genetics, Academic Press, Elsevier, 2001: 834-835
46. Kalkulator HWE: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> (dostopno 24.10.2012)
47. X^2 test: <http://graphpad.com/quickcalcs/chisquared1/> (dostopno 24.10.2012)
48. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs2776 (dostopno 29.10.2012)
49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs2301241 (dostopno 29.10.2012)

7. PRILOGE

Preglednica XVII: Značilnosti populacije nosečnic in otrok iz Hrvaške

| parameter | frekvenca | $\bar{x} \pm SD$ |
|---|-----------|------------------------------|
| starost matere ob porodu (leta) | | |
| < 30 let | 79 | 30,42 \pm 4,71 n=183 |
| 30-35 let | 80 | |
| >35 let | 24 | |
| ITM pred nosečnostjo (kg/m²) | | |
| <18,5 | 9 | 23,167 \pm 4,312 n=183 |
| 18,5-24,9 | 135 | |
| >24,9 | 39 | |
| kadilski status | | |
| nekadilka | 109 | n=174 |
| kadilka | 14 | |
| bivša kadilka (kadila 1-5 let) | 9 | |
| bivša kadilka (kadila 6-10 let) | 20 | |
| bivša kadilka (kadila >10 let) | 22 | |
| uživanje rib (g/teden) | | |
| < 150 | 29 | 303,26 \pm 193,23 n=208 |
| od 150 do 300 | 97 | |
| od 301 do 450 | 46 | |
| od 451 do 600 | 26 | |
| > 600 | 10 | |
| koncentracije Hg²⁺ in MeHg v laseh, krvi, popkovnični krvi, mleku in urinu (ng/g) | | |
| hHg | 212 | 865,29 \pm 1132,03 |
| hMeHg | 44 | 2073,75 \pm 1386,31 |
| mHg | 211 | 2,81 \pm 2,63 |
| mMeHg | 48 | 5,62 \pm 3,64 |
| cordHg | 196 | 4,34 \pm 4,53 |
| cordMeHg | 44 | 9,23 \pm 6,20 |
| muHg | 210 | 1,03 \pm 2,48 |
| milkHg | 117 | 0,268 \pm 0,388 |
| koncentracije Hg²⁺ v urinu novorojenčkov (ng/g) | | |
| buHg | 122 | 0,666 \pm 3,641 |
| koncentracija celokupnih PUFA v serumu (mg/ml) | | |
| < 1,5 | 7 | 1,7161 \pm 0,2415 n=57 |
| med 1,5 in 1,7 | 26 | |
| >1,7 | 24 | |
| koncentracije posameznega tipa PUFA (mg/ml) | | |
| PUFA_C18:2 | 57 | 0,5825 \pm 0,1393 |
| PUFA_C18:3 | | 0,0206 \pm 0,0044 |

| parameter | frekvenca | $\bar{x} \pm SD$ |
|------------|-----------|---------------------|
| PUFA_C20:4 | 57 | 0,0744 \pm 0,0335 |
| PUFA_C20:5 | | 0,0223 \pm 0,0031 |
| PUFA_C22:5 | | 0,0343 \pm 0,0084 |
| PUFA_C22:6 | | 0,0208 \pm 0,0026 |

PUFA: omega-3 maščobne kisline

18:2 = linolna kislina

18:3 = alfa-linolna kislina

20:4 = eikozatetraenojska kislina (ETA)

20:5 = eikozapentaenojska kislina (EPA)

22:5 = dokozaheksaenojska kislina (DPA)

22:6 = dokozaheksaenojska kislina (DHA)

Preglednica XVIII: Koncentracije Hg²⁺ in MeHg, izmerjene pri materah slovenskih otrok.

| parameter | frekvenca | $\bar{x} \pm SD$ |
|---|-----------|------------------|
| koncentracije Hg²⁺ in MeHg v laseh, krvi in popkovnični krvi (ng/g) | | |
| cordHg | 424 | 2,00 \pm 1,75 |
| cordMeHg | 14 | 6,77 \pm 2,94 |

Preglednica XIX: Pogostost posameznih genotipov preučevanih polimorfizmov.

| 12496C>T (rs2776) | | |
|-----------------------------------|------------------|----------|
| CRO matere (n=213) | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| CC | 65 | 30,5 |
| CT | 100 | 46,9 |
| TT | 48 | 22,5 |
| CRO otroci (n=179) | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| CC | 47 | 26,3 |
| CT | 89 | 49,7 |
| TT | 43 | 24,0 |
| SLO otroci (n=430) | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| CC | 129 | 30,0 |
| CT | 205 | 47,7 |
| TT | 96 | 22,3 |
| CRO&SLO otroci (n=609) | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| CC | 176 | 28,9 |
| CT | 294 | 48,3 |
| TT | 139 | 22,8 |

| -795A>G (rs 2301241) | | |
|--|-------------------------|-----------------|
| <i>CRO matere (n=213)</i> | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| AA | 50 | 23,5 |
| AG | 120 | 56,3 |
| GG | 43 | 20,2 |
| <i>CRO otroci (n=179)</i> | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| AA | 58 | 32,4 |
| AG | 87 | 48,6 |
| GG | 34 | 19,0 |
| <i>SLO otroci (n=430)</i> | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| AA | 120 | 27,9 |
| AG | 225 | 52,3 |
| GG | 85 | 19,8 |
| <i>CRO&SLO otroci (n=609)</i> | | |
| | <i>frekvenca</i> | <i>%</i> |
| AA | 178 | 29,2 |
| AG | 312 | 51,2 |
| GG | 119 | 19,5 |

Preglednica XX: Rezultati genotipizacije pri slovenskih novorojenčkih.

| št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 400070 | CT | AG | 400132 | CC | AA |
| 400073 | CC | AA | 400133 | TT | AG |
| 400074 | CT | AG | 400135 | CT | AA |
| 400075 | CC | GG | 400136 | CT | AA |
| 400076 | CC | AG | 400137 | CT | AA |
| 400077 | CC | GG | 400138 | CT | AA |
| 400078 | TT | AG | 400140 | TT | GG |
| 400085 | CC | AG | 400141 | CC | AA |
| 400089 | CT | AA | 400143 | CC | GG |
| 400090 | CC | AA | 400144 | CC | AG |
| 400091 | TT | GG | 400145 | CC | AA |
| 400093 | CC | AG | 400146 | CC | AG |
| 400096 | CT | AG | 400147 | CT | AG |
| 400097 | CC | AG | 400148 | CC | AA |
| 400098 | CC | AG | 400149 | CC | AA |
| 400099 | TT | AG | 400150 | TT | GG |
| 400100 | CC | AG | 400151 | TT | AG |
| 400101 | CT | GG | 400155 | CT | AA |
| 400103 | CC | AA | 400156 | CC | AG |
| 400104 | CT | GG | 400157 | CT | AA |
| 400105 | CT | AA | 400158 | CT | AG |
| 400106 | TT | AG | 400159 | TT | GG |
| 400107 | CT | GG | 400160 | TT | AG |
| 400108 | CT | AG | 400161 | CT | AA |
| 400109 | CT | AG | 400162 | TT | AG |
| 400110 | TT | AG | 400163 | CT | AG |
| 400111 | CT | AA | 400165 | CT | AG |
| 400112 | CT | AA | 400166 | CT | AG |
| 400113 | TT | AA | 400167 | CC | AG |
| 400114 | CC | AG | 400168 | CT | AA |
| 400115 | TT | AA | 400171 | CT | AG |
| 400116 | CT | AG | 400172 | TT | AG |
| 400117 | TT | AG | 400175 | CC | AA |
| 400121 | CT | AA | 400177 | CT | GG |
| 400122 | CC | AG | 400179 | CT | AG |
| 400123 | TT | AG | 400180 | CC | AG |
| 400124 | CT | AA | 400181 | TT | AG |
| 400126 | TT | AA | 400182 | CT | AG |
| 400129 | CT | AG | 400185 | CT | AA |
| 400130 | CT | AG | 400186 | TT | AG |
| 400131 | CT | AG | 400187 | CC | AG |

| št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 400188 | TT | GG | 400253 | CT | AA |
| 400189 | CT | AG | 400254 | CC | AG |
| 400190 | TT | GG | 400255 | CT | AG |
| 400191 | CT | AG | 400256 | CC | AG |
| 400192 | CT | AG | 400259 | CC | AA |
| 400193 | TT | GG | 400260 | CC | AA |
| 400194 | TT | AA | 400261 | TT | AG |
| 400195 | CT | AA | 400262 | CT | GG |
| 400196 | CC | AA | 400263 | CT | GG |
| 400198 | TT | AA | 400267 | CT | AG |
| 400199 | CC | AG | 400268 | CC | AG |
| 400200 | CT | AG | 400269 | CC | AG |
| 400201 | CC | AG | 400270 | CT | AG |
| 400206 | CC | AA | 400271 | CC | AG |
| 400207 | CT | AG | 400273 | CT | AG |
| 400208 | CT | AG | 400274 | CT | AG |
| 400209 | CC | AG | 400275 | TT | AG |
| 400210 | CT | AG | 400276 | CT | AG |
| 400211 | TT | GG | 400277 | TT | GG |
| 400212 | TT | AG | 400280 | TT | AG |
| 400213 | CT | GG | 400281 | CC | AG |
| 400214 | CC | GG | 400282 | CC | AG |
| 400215 | CC | AA | 400283 | CT | GG |
| 400221 | TT | AA | 400284 | CC | AG |
| 400222 | CT | AG | 400285 | TT | GG |
| 400226 | CC | AA | 400286 | CT | AG |
| 400228 | TT | AA | 400287 | TT | AG |
| 400229 | CC | AG | 400289 | CT | AG |
| 400230 | CT | AG | 400290 | CC | AG |
| 400231 | CT | AG | 400292 | CC | AA |
| 400232 | CC | AA | 400293 | TT | AA |
| 400233 | CC | AA | 400294 | CT | AG |
| 400235 | CT | AG | 400295 | CT | AG |
| 400237 | CC | AG | 400296 | CT | AA |
| 400238 | CT | AG | 400297 | CT | AG |
| 400239 | CC | AA | 400298 | TT | AG |
| 400240 | CC | AA | 400299 | CT | AA |
| 400241 | CT | AA | 400300 | CC | AG |
| 400242 | TT | AA | 400301 | CT | AG |
| 400248 | CC | AG | 400302 | CT | AG |
| 400250 | CT | AG | 400303 | CT | GG |
| 400251 | TT | GG | 400304 | CC | AG |
| 400252 | CT | AG | 400305 | CT | AG |

| št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 400306 | TT | GG | 400405 | CT | GG |
| 400307 | CT | AG | 400406 | CT | GG |
| 400308 | CC | AG | 400407 | CC | AA |
| 400309 | CC | AA | 400408 | CT | AG |
| 400310 | CC | AA | 400409 | CT | AG |
| 400311 | TT | AA | 400410 | CC | GG |
| 400312 | CT | AA | 400411 | TT | GG |
| 400313 | CT | AA | 400412 | CC | GG |
| 400314 | TT | AG | 400413 | CC | AA |
| 400315 | CT | AG | 400414 | CC | AG |
| 400316 | CT | AA | 400415 | CT | AG |
| 400317 | TT | AG | 400416 | CT | GG |
| 400318 | CT | GG | 400417 | CC | AA |
| 400319 | CT | GG | 400419 | CT | AG |
| 400320 | CC | GG | 400420 | CT | GG |
| 400321 | CT | AG | 400421 | CT | GG |
| 400322 | CT | AG | 400422 | CT | GG |
| 400323 | TT | AG | 400423 | TT | AG |
| 400324 | CT | AG | 400424 | CC | GG |
| 400325 | TT | AA | 400425 | TT | AG |
| 400326 | CT | GG | 400427 | CC | AA |
| 400327 | CT | AG | 400428 | CT | GG |
| 400328 | CT | AG | 400429 | CT | AG |
| 400329 | CT | AG | 400430 | CC | AG |
| 400330 | TT | AG | 400431 | CT | AA |
| 400333 | CC | AG | 400432 | TT | AG |
| 400334 | TT | GG | 400433 | CT | AA |
| 400335 | CT | GG | 400434 | CC | AA |
| 400336 | TT | AG | 400435 | CT | AG |
| 400338 | CT | AA | 400436 | CT | GG |
| 400339 | TT | AG | 400437 | CC | AG |
| 400340 | CT | AG | 400438 | CT | GG |
| 400391 | CT | AA | 400439 | TT | GG |
| 400392 | CC | AA | 400440 | CT | AG |
| 400395 | CT | AG | 400441 | CT | GG |
| 400396 | CC | AA | 400442 | TT | AG |
| 400397 | CC | GG | 400443 | CC | AG |
| 400399 | CT | AG | 400444 | CT | AG |
| 400400 | CT | AG | 400445 | CT | AG |
| 400401 | CT | AA | 400446 | CC | AG |
| 400402 | CC | AA | 400447 | CT | GG |
| 400403 | CC | AG | 400448 | TT | GG |
| 400404 | CT | AG | 400449 | CT | AA |

| št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 400450 | CT | AA | 400499 | CT | AG |
| 400451 | TT | GG | 400500 | TT | AG |
| 400452 | CT | AA | 400501 | CT | GG |
| 400453 | CC | AG | 400502 | CC | AG |
| 400454 | CT | AA | 400503 | CC | GG |
| 400455 | CT | AG | 400504 | CC | GG |
| 400456 | CT | AG | 400505 | CT | AG |
| 400457 | TT | AG | 400506 | CT | AA |
| 400458 | TT | AA | 400507 | CC | AA |
| 400459 | CC | AG | 400508 | CC | AG |
| 400460 | CT | AA | 400513 | CC | AG |
| 400461 | CC | AA | 400514 | CT | AG |
| 400463 | CT | GG | 400515 | CT | GG |
| 400466 | TT | AG | 400516 | CT | AA |
| 400467 | TT | AG | 400517 | CT | GG |
| 400468 | CT | AA | 400518 | CT | AG |
| 400470 | CT | GG | 400521 | TT | GG |
| 400471 | CT | AG | 400522 | CT | AA |
| 400472 | CT | GG | 400523 | TT | AG |
| 400473 | CC | AG | 400524 | CC | AA |
| 400474 | CC | GG | 400526 | TT | AG |
| 400475 | CC | AA | 400528 | TT | AG |
| 400476 | CT | AG | 400529 | CC | GG |
| 400477 | TT | AG | 400530 | TT | AG |
| 400478 | TT | AG | 400532 | CC | AA |
| 400479 | CT | GG | 400534 | CT | AG |
| 400480 | CT | GG | 400547 | CT | GG |
| 400481 | CT | AG | 400548 | TT | AG |
| 400482 | TT | AG | 400550 | TT | AG |
| 400483 | CT | GG | 400551 | CT | AG |
| 400484 | CC | AA | 400552 | TT | AG |
| 400486 | CT | AA | 400553 | CC | AG |
| 400487 | CT | AA | 400554 | CT | AG |
| 400488 | CC | AG | 400555 | CT | GG |
| 400489 | TT | AA | 400556 | CC | AA |
| 400490 | CC | AG | 400557 | CC | AG |
| 400491 | CT | GG | 400558 | TT | AG |
| 400492 | CC | GG | 400559 | CT | AG |
| 400493 | CT | AA | 400560 | CC | AA |
| 400494 | CT | AG | 400561 | TT | AA |
| 400495 | CC | GG | 400562 | CT | AA |
| 400496 | CC | AA | 400563 | TT | AG |
| 400497 | TT | AG | 400564 | TT | AG |

| št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 400565 | TT | AG | 400608 | CC | AG |
| 400566 | CT | GG | 400609 | CT | AG |
| 400567 | CT | AA | 400610 | CT | AG |
| 400568 | CC | AA | 400611 | CC | AA |
| 400569 | CC | AG | 400612 | CC | AG |
| 400570 | TT | AG | 400613 | CC | AG |
| 400571 | CC | AG | 400614 | TT | GG |
| 400572 | CT | AA | 400615 | TT | AG |
| 400573 | TT | AG | 400616 | CT | AG |
| 400574 | CC | GG | 400617 | CC | AA |
| 400575 | CT | AG | 400618 | TT | AG |
| 400576 | CT | AA | 400619 | CT | AG |
| 400577 | CT | AG | 400620 | CC | AG |
| 400578 | CC | AG | 400621 | CC | GG |
| 400579 | CC | AA | 400622 | CC | AA |
| 400580 | TT | AG | 400623 | TT | AG |
| 400581 | CT | AA | 400624 | CT | AG |
| 400582 | CT | AG | 400625 | CT | AG |
| 400583 | CT | AG | 400626 | CT | AA |
| 400584 | TT | GG | 400627 | CC | AA |
| 400585 | CT | GG | 400628 | TT | AA |
| 400586 | CT | AG | 400629 | CC | AA |
| 400587 | CT | AA | 400630 | CT | AG |
| 400588 | CC | AG | 400631 | CC | GG |
| 400589 | CT | AG | 400632 | TT | AA |
| 400590 | CC | AG | 400633 | CC | AG |
| 400591 | CT | GG | 400634 | CT | AA |
| 400592 | CT | AG | 400635 | TT | GG |
| 400593 | CC | AA | 400636 | CT | AG |
| 400594 | TT | AG | 400637 | n.p. | AA |
| 400595 | CT | AG | 400638 | CT | AG |
| 400596 | CT | AA | 400639 | CT | GG |
| 400597 | CC | AG | 400640 | CT | AA |
| 400598 | CC | GG | 400641 | CT | GG |
| 400599 | CT | AG | 400642 | CC | AG |
| 400600 | TT | AG | 400644 | CT | AG |
| 400601 | CT | AG | 400645 | CC | AA |
| 400602 | TT | AG | 400646 | CC | AG |
| 400603 | CT | GG | 400647 | TT | AA |
| 400604 | CT | AG | 400648 | CT | AG |
| 400605 | CT | AA | 400649 | CT | AA |
| 400606 | CT | AA | 400650 | TT | GG |
| 400607 | CT | AG | 400651 | CT | AG |

| št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | št.vzorca | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------|----------------------|------------------------|
| 400652 | CT | AA | 400655 | CT | AG |
| 400653 | CT | AG | 400656 | CT | GG |
| 400654 | CT | GG | | | |

Preglednica XXI: Rezultati genotipizacije pri nosečnicah in novorojenčkih iz Hrvaške. Siva polja: ni vzorca.

| številka vzorca | NOSEČNICE | | NOVOROJENČKI | |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
| 100001 | | | CT | AG |
| 100003 | | | CT | GG |
| 100004 | | | CC | AG |
| 100005 | | | CC | AG |
| 100006 | | | CT | AA |
| 100008 | | | CT | AA |
| 100009 | | | CC | AA |
| 100010 | | | CC | AA |
| 100012 | TT | GG | CT | AG |
| 100013 | CT | AG | TT | AG |
| 100015 | CT | GG | CT | GG |
| 100016 | CC | AG | CC | AA |
| 100017 | CC | AG | | |
| 100018 | TT | AG | TT | GG |
| 100020 | TT | AG | TT | AA |
| 100021 | CT | AG | | |
| 100022 | CT | AG | CC | AG |
| 100023 | CT | AG | CC | AA |
| 100024 | CC | AG | CC | AG |
| 100025 | CT | AG | TT | GG |
| 100026 | CT | AG | CT | AG |
| 100027 | TT | AG | TT | GG |
| 100028 | CT | AA | | |
| 100029 | CC | AG | CC | AA |
| 100030 | TT | AG | TT | GG |
| 100031 | CC | AG | CC | AG |
| 100032 | CC | AG | CC | AA |
| 100033 | CT | AG | CC | AG |
| 100035 | CC | GG | CT | GG |
| 100036 | TT | AG | TT | AG |
| 100037 | CC | GG | CT | AG |
| 100038 | CT | AA | TT | AG |

| številka vzorca | NOSEČNICE | | NOVOROJENČKI | |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
| 100039 | CT | AG | CC | AA |
| 100040 | TT | AG | TT | AA |
| 100041 | CC | AG | CT | AG |
| 100042 | CT | AA | CT | AA |
| 100043 | CC | AG | CC | AA |
| 100044 | CT | AG | | |
| 100045 | CT | AG | TT | AA |
| 100046 | TT | GG | CT | GG |
| 100047 | CT | GG | CC | AG |
| 100049 | | | TT | GG |
| 100050 | CC | AA | CT | AG |
| 100051 | CT | AA | TT | AA |
| 100052 | CT | AA | TT | AA |
| 100053 | CT | AG | | |
| 100054 | CT | GG | TT | GG |
| 100055 | CT | AG | CT | AG |
| 100056 | CT | AG | CT | AG |
| 100057 | TT | GG | | |
| 100058 | TT | GG | CT | AG |
| 100059 | | | CT | AG |
| 100060 | TT | AA | TT | AG |
| 100061 | | | CC | AG |
| 100062 | TT | GG | TT | AG |
| 100063 | CT | AA | TT | AA |
| 100064 | CC | AG | CT | AA |
| 100065 | CC | AA | CT | AG |
| 100066 | TT | AG | CT | AA |
| 100067 | CT | GG | TT | AG |
| 100068 | CC | AG | CT | AG |
| 100069 | CT | AG | CC | AA |
| 100070 | CC | AA | CT | AG |
| 100071 | CC | AG | CT | AG |
| 100072 | CT | AG | CT | AA |
| 100073 | CT | AG | CT | AA |
| 100074 | TT | AG | TT | AA |
| 100075 | CT | AG | CT | AA |
| 100076 | CT | AG | TT | GG |
| 100077 | CC | AG | CT | GG |
| 100078 | CT | AG | TT | AG |
| 100079 | TT | AG | TT | AA |
| 100080 | CC | AA | CT | AA |

| številka vzorca | NOSEČNICE | | NOVOROJENČKI | |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
| 100081 | TT | AA | CT | AA |
| 100082 | TT | AG | TT | GG |
| 100083 | TT | AA | CT | AA |
| 100084 | CT | GG | TT | AG |
| 100085 | CT | AG | TT | AG |
| 100086 | CC | AA | | |
| 100087 | TT | AG | CT | AG |
| 100088 | CC | AG | CC | AA |
| 100089 | CT | AG | TT | AG |
| 100090 | CT | GG | CT | AG |
| 100091 | CT | AG | CC | GG |
| 100092 | CC | AG | CC | GG |
| 100093 | CT | AG | CT | AA |
| 100094 | CT | AG | CC | AG |
| 100095 | CC | AA | CC | AG |
| 100096 | TT | AG | TT | AG |
| 100097 | CC | AA | CT | AG |
| 100098 | CC | GG | CT | AG |
| 100099 | CC | AA | CT | AA |
| 100100 | CT | AG | CT | AG |
| 100101 | TT | AG | CT | GG |
| 100102 | CT | AA | | |
| 100103 | CT | AG | CT | AG |
| 100104 | CC | AG | CT | GG |
| 100105 | TT | GG | CT | AG |
| 100106 | CT | AG | | |
| 100107 | CT | GG | | |
| 100108 | CT | AG | | |
| 100109 | CT | AG | TT | AA |
| 100110 | CT | GG | CC | AG |
| 100111 | TT | AG | | |
| 100112 | | | CT | AA |
| 100113 | CT | AG | TT | AG |
| 100114 | CT | AG | | |
| 100115 | CT | AG | | |
| 100116 | CT | GG | CT | AG |
| 100117 | TT | GG | CT | GG |
| 100118 | CT | AA | CT | AA |
| 100119 | TT | AG | CT | AA |
| 100120 | TT | AG | CT | GG |
| 100121 | CC | AA | CC | AA |

| številka vzorca | NOSEČNICE | | NOVOROJENČKI | |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
| 100122 | TT | GG | TT | AG |
| 100123 | TT | AG | | |
| 100124 | CC | AA | CT | AG |
| 100125 | CT | GG | TT | AG |
| 100126 | TT | AG | TT | AG |
| 100127 | CT | AA | CT | AA |
| 100128 | CC | AA | CC | AA |
| 100129 | CT | AG | | |
| 100130 | TT | AA | CT | AA |
| 100131 | TT | AG | TT | GG |
| 100132 | CC | AA | CC | AG |
| 100133 | TT | GG | CT | AG |
| 100134 | CT | AG | CT | AG |
| 100135 | CT | AA | CC | AG |
| 100136 | CT | AG | CT | AA |
| 100137 | TT | AA | TT | AG |
| 100138 | CT | AG | CC | AG |
| 100139 | CT | AA | CC | AA |
| 100140 | CT | AA | CT | AG |
| 100141 | CT | GG | CT | GG |
| 100142 | CT | GG | TT | GG |
| 100143 | CC | AG | CT | AG |
| 100144 | CC | AG | | |
| 100145 | TT | AG | TT | AA |
| 100146 | CC | AG | CT | AG |
| 100147 | CC | GG | CT | GG |
| 100148 | CT | AG | TT | AA |
| 100149 | CC | AG | CC | AG |
| 100150 | CT | GG | CT | AG |
| 100151 | CT | GG | CT | AG |
| 100152 | CT | AG | CT | AG |
| 100153 | CC | AG | CC | AA |
| 100154 | CC | AG | CC | AG |
| 100155 | CT | AG | | |
| 100156 | CT | AA | CT | AA |
| 100157 | CT | GG | CC | AG |
| 100158 | CT | AG | CT | AA |
| 100159 | CC | AG | CC | AA |
| 100160 | CT | AG | CT | AG |
| 100161 | CC | AA | CC | AG |
| 100162 | CC | GG | CT | GG |

| številka vzorca | NOSEČNICE | | NOVOROJENČKI | |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
| 100163 | CT | AG | | |
| 100164 | CC | AG | | |
| 100165 | TT | AG | CT | AA |
| 100166 | TT | GG | CT | GG |
| 100167 | CT | AG | CC | GG |
| 100168 | CT | AG | CT | AG |
| 100169 | CT | GG | CT | GG |
| 100170 | TT | GG | CT | AG |
| 100171 | CT | AG | CT | AG |
| 100172 | TT | GG | | |
| 100173 | TT | GG | TT | GG |
| 100174 | TT | AA | | |
| 100175 | TT | GG | | |
| 100176 | TT | GG | CT | AG |
| 100177 | CT | GG | | |
| 100178 | CC | AG | CT | AG |
| 100179 | CC | AA | CT | AG |
| 100180 | CT | GG | CC | AG |
| 100181 | CC | AG | TT | GG |
| 100182 | CC | AG | CC | AA |
| 100183 | CT | AG | CT | AG |
| 100184 | CC | AA | | |
| 100185 | TT | AG | CT | AA |
| 100186 | CT | AG | | |
| 100187 | CC | AG | CT | AG |
| 100188 | CC | AG | CC | GG |
| 100190 | CC | AG | CC | GG |
| 100191 | CT | AA | CC | AA |
| 100192 | CC | AA | CC | AA |
| 100193 | CC | AG | CT | AG |
| 100194 | CT | AG | CC | AA |
| 100195 | CC | AG | CC | AG |
| 100196 | CC | GG | CC | GG |
| 100197 | CT | AG | CT | AA |
| 100198 | CT | AG | | |
| 100199 | CT | AA | CT | AA |
| 100200 | CC | AG | CT | AG |
| 100201 | CT | AG | CC | AG |
| 100202 | CT | AA | TT | AG |
| 100203 | CT | AA | | |
| 100205 | CT | AG | TT | AG |

| številka vzorca | NOSEČNICE | | NOVOROJENČKI | |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) | 12496C>T (rs2776) | -795A>G (rs2301241) |
| 100206 | TT | AG | CT | AG |
| 100207 | CC | AA | | |
| 100208 | CC | GG | | |
| 100209 | CT | GG | CT | AG |
| 100210 | CC | AG | CT | AG |
| 100211 | CT | AA | CT | AG |
| 100212 | TT | AA | | |
| 100213 | CC | AA | CT | AG |
| 100214 | CT | AG | | |
| 100215 | CT | AG | | |
| 100216 | CC | AA | | |
| 100217 | CC | AA | | |
| 100218 | TT | AG | | |
| 100219 | TT | AG | CT | AA |
| 100220 | CC | AA | | |
| 100221 | CT | AA | | |
| 100222 | CT | AA | | |
| 100223 | CT | AG | | |
| 100224 | CT | AG | | |
| 100225 | CT | AA | | |
| 100226 | CT | AG | CT | AA |
| 100227 | CC | AG | | |
| 100228 | CC | AA | CC | AA |
| 100229 | CC | GG | | |
| 100230 | CT | AG | TT | GG |
| 100231 | TT | AG | TT | GG |
| 100232 | CC | GG | | |
| 100233 | CT | AG | CT | AG |
| 100234 | CT | AG | | |

Preglednica XXII: Povprečne vrednosti Hg²⁺ in MeHg (ng/g) pri materah iz Hrvaške glede na genotip preučevanih polimorfizmov.

| GENOTIP 12496C>T (rs2776) | | hHg | hMeHg | mHg | mMeHg | cordHg | cord MeHg | muHg | milkHg |
|--|----|---------|---------|------|-------|--------|--------------|-------|--------|
| CC | SV | 773,71 | 1577,07 | 2,77 | 4,95 | 4,16 | 8,57 | 0,947 | 0,338 |
| | N | 65 | 15 | 65 | 16 | 61 | 14 | 65 | 33 |
| | SD | 659,16 | 604,35 | 2,14 | 2,46 | 3,73 | 4,47 | 1,216 | 0,476 |
| CT | SV | 806,15 | 2223,43 | 2,53 | 4,98 | 3,78 | 9,02 | 1,114 | 0,213 |
| | N | 99 | 14 | 98 | 17 | 88 | 14 | 99 | 56 |
| | SD | 1223,18 | 1321,28 | 2,50 | 3,96 | 4,23 | 7,25 | 3,351 | 0,289 |
| TT | SV | 1111,27 | 2430,73 | 3,43 | 5,91 | 5,61 | 9,99 | 0,949 | 0,296 |
| | N | 48 | 15 | 48 | 15 | 47 | 16 | 46 | 28 |
| | SD | 1400,36 | 1869,02 | 3,32 | 4,40 | 5,71 | 6,80 | 1,416 | 0,443 |
| GENOTIP -795A>G (rs2301241) | | hHg | hMeHg | mHg | mMeHg | cordHg | cord MeHg | muHg | milkHg |
| AA | SV | 730,60 | 1598,00 | 2,63 | 5,12 | 4,21 | 8,68 | 0,834 | 0,211 |
| | N | 50 | 10 | 50 | 10 | 48 | 10 | 50 | 30 |
| | SD | 580,10 | 539,45 | 1,94 | 1,97 | 3,45 | 3,97 | 1,139 | 0,244 |
| AG | SV | 935,26 | 2429,17 | 2,93 | 5,54 | 4,40 | 9,93 | 1,095 | 0,321 |
| | N | 120 | 23 | 119 | 27 | 109 | 23 | 118 | 65 |
| | SD | 1394,68 | 1772,48 | 3,05 | 4,53 | 5,22 | 7,93 | 3,086 | 0,460 |
| GG | SV | 825,71 | 1763,09 | 2,68 | 4,71 | 4,31 | 8,28 | 1,063 | 0,190 |
| | N | 42 | 11 | 42 | 11 | 39 | 11 | 42 | 22 |
| | SD | 713,55 | 683,62 | 1,99 | 2,17 | 3,60 | 3,24 | 1,670 | 0,292 |

Legenda: SV: srednja vrednost, N: frekvenca, SD: standardna deviacija

Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti Hg²⁺ in MeHg (ng/g) v popkovnični krvi in urinu novorojenčkov iz Hrvaške glede na genotip preučevanih polimorfizmov.

| GENOTIP 12496C>T (rs2776) | | buHg | cordHg | cord MeHg | GENOTIP -795A>G (rs2301241) | | buHg | cordHg | cord MeHg |
|--|----|-------|--------|--------------|--|----|-------|--------|--------------|
| CC | SV | 0,440 | 4,153 | 7,980 | AA | SV | 0,396 | 4,276 | 8,900 |
| | N | 21 | 38 | 8 | | N | 35 | 53 | 11 |
| | SD | 0,545 | 3,163 | 3,750 | | SD | 0,495 | 4,698 | 6,841 |
| CT | SV | 1,111 | 4,423 | 9,013 | AG | SV | 1,202 | 4,427 | 8,553 |
| | N | 52 | 80 | 19 | | N | 48 | 75 | 18 |
| | SD | 5,554 | 4,663 | 6,795 | | SD | 5,782 | 4,141 | 5,531 |
| TT | SV | 0,361 | 4,582 | 11,623 | GG | SV | 0,310 | 4,545 | 12,547 |
| | N | 29 | 41 | 9 | | N | 19 | 31 | 7 |
| | SD | 0,472 | 6,093 | 8,639 | | SD | 0,280 | 6,214 | 9,282 |

Legenda: SV: srednja vrednost, N: frekvenca, SD: standardna deviacija

Preglednica XXIV: Rezultati testov ANCOVA - vpliv kovariat $c(\text{Hg}^{2+})$ (ng/g) v laseh, krvi in popkovnični krvi hrvaških mater glede na genotip polimorfizma 12496C>T pri hrvaških materah

| KOVARIATA/KOMBINACIJE | lnhHg | | lnmHg | | IncordHg | |
|---------------------------|--------|-----|--------|-----|----------|-----|
| | p | N | p | N | p | N |
| lnTotal_fish | 0,148* | 205 | 0,104* | 204 | 0,052* | 189 |
| total_PUFA_mgml | 0,960 | 57 | 0,789 | 57 | 0,811 | 53 |
| PUFA_C18_2 | 0,972 | 57 | 0,798 | 57 | 0,813 | 53 |
| PUFA_C20_4 | 0,968 | 57 | 0,784 | 57 | 0,838 | 53 |
| PUFA_C20_5 | 0,905 | 57 | 0,711 | 57 | 0,723 | 53 |
| PUFA_C22_6 | 0,978* | 57 | 0,811 | 57 | 0,827 | 53 |
| lnmMn | 0,200 | 205 | 0,179 | 204 | 0,054 | 189 |
| mCu | 0,208 | 205 | 0,183 | 204 | 0,053 | 189 |
| mZn | 0,273 | 205 | 0,207 | 204 | 0,070 | 189 |
| lnmAs | 0,123* | 205 | 0,068* | 204 | 0,007* | 189 |
| mSe | 0,191* | 205 | 0,155* | 204 | 0,035* | 189 |
| lnmCd | 0,220 | 205 | 0,190 | 204 | 0,053 | 189 |
| lnmPb | 0,164 | 205 | 0,127 | 204 | 0,033 | 189 |
| cordMn | 0,022* | 195 | 0,021* | 194 | 0,009* | 195 |
| cordCu | 0,040 | 195 | 0,041 | 194 | 0,021* | 195 |
| lncordZn | 0,033 | 195 | 0,039 | 194 | 0,020* | 195 |
| cordSe | 0,042* | 195 | 0,047* | 194 | 0,033* | 195 |
| lncordPb | 0,023* | 195 | 0,025* | 194 | 0,014* | 195 |
| lnmilkMn | 0,147 | 115 | 0,140 | 115 | 0,086* | 107 |
| milkCu | 0,160 | 115 | 0,144 | 115 | 0,092 | 107 |
| milkZn | 0,154 | 115 | 0,125 | 115 | 0,099 | 107 |
| milkSe | 0,099* | 115 | 0,091* | 115 | 0,052* | 107 |
| lnmilkCd | 0,152 | 115 | 0,135 | 115 | 0,099 | 107 |
| kajenje | 0,096 | 174 | 0,129 | 173 | 0,091 | 167 |
| starost | 0,079* | 183 | 0,079* | 182 | 0,045* | 176 |
| lnITM | 0,127* | 183 | 0,102* | 182 | 0,099* | 175 |
| cordMn + cordSe | 0,032* | 194 | 0,031* | 194 | 0,019* | 195 |
| cordMn + IncordZn | 0,024* | 195 | 0,024* | 194 | 0,010* | 195 |
| cordMn+cordSe + IncordZn | 0,042 | 195 | 0,044 | 194 | 0,026* | 195 |
| lnmMn + mSe | 0,148* | 205 | 0,130* | 204 | 0,033* | 189 |
| lnmMn + mZn | 0,254 | 205 | 0,195 | 204 | 0,073 | 189 |
| lnmMn + mSe + mZn | 0,428* | 205 | 0,348* | 204 | 0,127* | 189 |
| kajenje + starost | 0,159* | 172 | 0,214* | 171 | 0,166* | 150 |
| kajenje + lnITM | 0,242* | 172 | 0,249* | 171 | 0,263* | 165 |
| starost + lnITM | 0,216* | 181 | 0,171* | 180 | 0,132* | 174 |
| kajenje + starost + lnITM | 0,368* | 170 | 0,387* | 169 | 0,366* | 164 |

* - Oznaka pomeni, da kovariata/kombinacija kovariat korelira z osnovno spremenljivko (lnhHg, lnmHg oz. IncordHg); testirano s Pearsonovim koeficientom korelacije.

Preglednica XXV: Vpliv kovariat na $c(\text{Hg}^{2+})$ (ng/g) v popkovnični krvi hrvaških mater glede na kombinacijo genotipov polimorfizma -795A>G hrvaških mater in otrok

| KOVARIATA/KOMBINACIJE | IncordHg | |
|-----------------------------|----------|-----|
| | p | N |
| lnTotal_fish | 0,066* | 153 |
| total_PUFA_mgml | 0,991 | 53 |
| PUFA_C18_2 | 0,990 | 53 |
| PUFA_C20_4 | 0,988 | 53 |
| PUFA_C20_5 | 0,929 | 53 |
| PUFA_C22_6 | 0,992 | 53 |
| lnmMn | 0,037 | 155 |
| mCu | 0,036 | 155 |
| mZn | 0,050 | 155 |
| lnmAs | 0,005* | 155 |
| mSe | 0,005* | 155 |
| lnmCd | 0,038 | 155 |
| lnmPb | 0,034 | 155 |
| cordMn | 0,024* | 158 |
| cordCu | 0,045* | 158 |
| ln cordZn | 0,046* | 158 |
| cordSe | 0,023* | 158 |
| ln cordPb | 0,093* | 158 |
| lnmilkMn | 0,239* | 90 |
| milkCu | 0,386 | 90 |
| milkZn | 0,317 | 90 |
| milkSe | 0,121* | 90 |
| lnmilkCd | 0,280 | 90 |
| kajenje | 0,041 | 133 |
| starost | 0,054* | 141 |
| lnITM | 0,119* | 140 |
| cordMn + cordSe | 0,017* | 158 |
| cordMn + ln cordZn | 0,018* | 158 |
| cordMn + cordSe + ln cordZn | 0,009* | 158 |
| lnmMn + mSe | 0,011* | 155 |
| lnmMn + mZn | 0,048 | 155 |
| lnmMn + mSe + mZn | 0,057* | 155 |
| kajenje + starost | 0,031* | 132 |
| kajenje + lnITM | 0,095* | 131 |
| starost+lnITM | 0,097* | 139 |
| kajenje + starost + lnITM | 0,071* | 130 |

* - Oznaka pomeni, da kovariata/kombinacija kovariat korelira z osnovno spremenljivko (lnH_g, lnmH_g oz. IncordH_g); testirano s Pearsonovim koeficientom korelacije.