

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA ŠKULJ

DIPLOMSKA NALOGA

VPLIV SPREMEMB V GENIH *GSR*, *GSTT1* IN *GSTM1* NA KONCENTRACIJE
TEŽKIH KOVIN PRI NOSEČNICAH

UNIVERZITENI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA ŠKULJ

DIPLOMSKA NALOGA

VPLIV SPREMEMB V GENIH *GSR*, *GSTT1* IN *GSTM1* NA KONCENTRACIJE
TEŽKIH KOVIN PRI NOSEČNICAH

INFLUENCE OF *GSR*, *GSTT1* AND *GSTM1* GENE VARIANTS ON HEAVY METAL
CONCENTRATIONS OF PREGNANT WOMEN

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag.farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag.farm. Vzorci krvi in las nosečnic ter popkovnične krvi so bili odvzeti na Hrvaškem (Klinički bolnički center, Klinika za ginekologijo in porodništvo, Reka). Meritve koncentracij kovin so bile opravljene na Inštitutu Jožef Štefan.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Janji Marc in somentorici asist. dr. Simoni Jurković Mlakar, ki sta mi omogočili izdelavo diplomske naloge. Za pomoč in praktične nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela diplomske naloge, se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Posebna zahvala gre moji družini in prijateljem, ki so mi pomagali pri uresničitvi študijskih ciljev.

Izjava

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

Ljubljana, april 2012

Alenka Škulj

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag.farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Jurij Trontelj, mag.farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
KAZALO SLIK	viii
KAZALO PREGLEDNIC	ix
KAZALO GRAFOV	xi
1 UVOD	1
1.1 Kovine	1
1.2 Toksične kovine	4
1.2.1 Živo srebro	5
1.2.2 Svinec in kadmij	7
1.3 Esencialni elementi	9
1.4 Transplacentarni transport	11
1.4.1 Prenatalna izpostavljenost toksičnim kovinam	12
1.5 S toksičnimi kovinami inducirani oksidativni stres in glutationski antioksidantni obrambni sistem v bioloških procesih	15
1.5.1 Glutation	16
1.5.2 Od glutaciona odvisen encimski antioksidantni obrambni sistem	17
1.5.2.1 Glutation reduktaza (GSR)	17
1.5.2.2 Glutation S-transferaza	19
1.6 Kandidatni geni udeleženi v metabolizmu toksičnih kovin	21
2 NAMEN DELA	22
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 Opis preiskovank	23
3.2 Določitev koncentracije kovin	23
3.3 Izolacija DNK in preverjanje uspešnosti izolacije DNK	24
3.4 Ugotavljanje polimorfizma v intronu 3 gena za GSR	25

3.4.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	25
3.4.1.1	Princip	25
3.4.1.2	Reagenti.....	25
3.4.1.3	Aparature in oprema.....	26
3.4.1.4	Postopek	26
3.4.2	Agarozna gelska elektroforeza	28
3.4.2.1	Princip	28
3.4.2.2	Reagenti.....	28
3.4.2.3	Aparature in oprema.....	28
3.4.2.4	Postopek	29
3.4.3	Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in elektroforeza .	30
3.4.3.1	Princip	30
3.4.3.2	Reagenti.....	30
3.4.3.3	Aparature in oprema.....	31
3.4.3.4	Postopek	31
3.5	Ugotavljanje delecijjskih polimorfizmov GSTM1*0 in GSTT1*0.....	32
3.5.1	Večkratna sočasna verižna reakcija s polimerazo in elektroforeza	32
3.5.1.1	Princip	32
3.5.1.2	Reagenti.....	33
3.5.1.3	Aparature in oprema.....	34
3.5.1.4	Postopek	34
3.6	Statistične metode	36
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1	Značilnosti preiskovank	37
4.2	Ugotavljanje polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G)	38
4.2.1	Osnovne značilnosti polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) in njegova pogostnost pri nosečnicah iz Hrvaške.....	40
4.2.2	Ocena povezanosti polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi.....	41

4.3	Ugotavljanje delecijjskih polimorfizmov <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	45
4.3.1	Pogostnost delecijjskih polimorfizmov <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i> pri nosečnicah iz Hrvaške	47
4.3.2	Ocena povezanosti delecijjskega polimorfizma <i>GSTM1*0</i> , delecijjskega polimorfizma <i>GSTT1*0</i> in kombinacije obeh delecijjskih polimorfizmov s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi	48
4.3.2.1	Ocena povezanosti delecijjskega polimorfizma <i>GSTM1*0</i> s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi	49
4.3.2.2	Ocena povezanosti delecijjskega polimorfizma <i>GSTT1*0</i> s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi	51
4.3.2.3	Ocena povezanosti kombinacije obeh delecijjskih polimorfizmov s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi	53
4.4	Ocena povezanosti polimorfizma <i>GSRint3 (A>G)</i> , delecijjskih polimorfizmov <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i> ter njihovih kombinacij s koncentracijami mangana in selena v krvi nosečnic ter popkovnični krvi	58
4.4.1	Ocena povezanosti polimorfizma <i>GSRint3 (A>G)</i> s koncentracijami mangana in selena v krvi nosečnic ter popkovnični krvi	58
4.4.2	Ocena povezanosti delecijjskega polimorfizma <i>GSTM1*0</i> , delecijjskega polimorfizma <i>GSTT1*0</i> in kombinacije obeh delecijjskih polimorfizmov s koncentracijami mangana in selena v krvi nosečnic ter popkovnični krvi	61
5	SKLEP.....	64
6	LITERATURA.....	66
7	PRILOGE.....	71
7.1	Značilnosti preiskovank	71
7.2	Rezultati genotipizacije	73
7.3	Statistična analiza polimorfizma <i>GSRint3 (A>G)</i>	76
7.4	Statistična analiza delecijjskih polimorfizmov <i>GSTM1*0</i> , <i>GSTT1*0</i> in kombinacije obeh polimorfizmov	79

POVZETEK

VPLIV SPREMEMB V GENIH *GSR*, *GSTT1* IN *GSTMI* NA KONCENTRACIJE TEŽKIH KOVIN PRI NOSEČNICAH

Prekomerna kronična izpostavljenost nosečnic težkim kovinam predstavlja nevarnost, ker lahko preidejo skozi placento in poškodujejo organske sisteme razvijajočega se otroka, ki še nima popolnoma razvitih regulatornih mehanizmov. Izpostavljenost med nosečnostjo lahko povzroči pri zarodku različne posledice, ki se razlikujejo od tistih pri odraslih. Za različen metabolizem kovin v telesu posameznikov so odgovorni genetski polimorfizmi genov, ki so sestavni del glutationskega sistema.

V diplomski nalogi smo poskušali ugotoviti povezanost delecijских polimorfizmov v genih za encima glutation S-transferaza mu 1 in theta 1 (*GSTMI*0* in *GSTT1*0*) ter polimorfizma v intronu 3 gena za encim glutation reduktaza (*GSRint3* (A>G)), s koncentracijami kovin v popkovnični krvi in polni venski krvi ter laseh nosečnic. V raziskavo smo vključili 212 preiskovank. Prisotnost delecijских polimorfizmov *GSTMI*0* in *GSTT1*0* smo ugotovili s pomočjo večkratne sočasne verižne reakcije s polimerazo in elektroforezo. Za določitev polimorfizma v *GSRint3* (A>G) smo prav tako izvedli verižno reakcijo s polimerazo, ki ji je sledila analiza polimorfizmov dolžin restrikcijских fragmentov in elektroforeza. Na koncu je sledila statistična obdelava podatkov s pomočjo programa PASW Statistics 18 (Release 18.0.0).

Ugotovili smo, da je *GSRint3* (A>G) polimorfizem (mejno) statistično značilno povezan s koncentracijami svinca v krvi preiskovank ($p=0,044$) in popkovnični krvi ($p=0,095$), pri čemer imajo nosilke genotipa GG nižje vrednosti svinca. Za delecijски polimorfizem *GSTMI*0* smo prav tako ugotovili statistično značilno povezavo s koncentracijami svinca v krvi preiskovank ($p=0,004$) in popkovnični krvi ($p=0,051$). Preiskovanke z delecijo gena *GSTMI* imajo v povprečju višje vrednosti svinca v primerjavi s preiskovankami, ki imajo prisoten *GSTMI* gen. Delecijски polimorfizem *GSTT1*0* je (mejno) statistično značilno povezan s koncentracijami metilživega srebra v laseh ($p=0,090$) in krvi ($p=0,077$) preiskovank ter popkovnični krvi ($p=0,028$). Preiskovanke s prisotno delecijo gena *GSTT1* imajo višje vrednosti metilživega srebra v primerjavi s preiskovankami, ki imajo prisoten *GSTT1* gen. Kombinacija obeh delecijских polimorfizmov je statistično značilno povezana s koncentracijami svinca v krvi preiskovank ($p=0,029$), ob vključitvi kovariat pa tudi s koncentracijami metilživega srebra v krvi in laseh preiskovank ter popkovnični krvi. Koncentracije navedenih kovin dosegajo pri preiskovankah z obema delecijama najvišje vrednosti. S Kruskal-Wallisovim neparametričnim testom smo ugotovili, da je kombinacija obeh delecijских polimorfizmov statistično značilno povezana s koncentracijami kadmija v popkovnični krvi ($p=0,032$). Preiskovanke z delecijo obeh odsekov genov so imele najvišje vrednosti kadmija v popkovnični krvi.

Poleg tega smo ugotovili povezanost omenjenih genskih sprememb s koncentracijami esencialnih elementov, kot sta selen in mangan. *GSRint3* (A>G) polimorfizem je (mejno) statistično značilno povezan s koncentracijami selena v popkovnični krvi ($p=0,064$) in mangana v krvi preiskovank ($p=0,035$). Nosilke genotipa GG imajo nižje vrednosti selena in mangana. Za delecijски polimorfizem *GSTMI*0* smo ugotovili statistično značilno povezavo z zvišanimi koncentracijami mangana v krvi preiskovank ($p=0,012$). Prav tako se je pokazala povezanost kombinacije obeh delecijских polimorfizmov s koncentracijami mangana v krvi preiskovank ($p=0,069$). Le-te so pri preiskovankah z obema delecijama višje kot pri nosilkah obeh genov.

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da so genske spremembe v genih za *GSR*, *GSTMI* in *GSTT1* povezane s koncentracijami težkih kovin in tudi esencialnih elementov v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi. Omenjene genske polimorfizme bi lahko upoštevali kot napovedni dejavnik občutljivosti pri prenatalni izpostavljenosti otrok toksičnim kovinam.

ABSTRACT
INFLUENCE OF *GSR*, *GSTT1* AND *GSTM1* GENE VARIANTS ON HEAVY METAL CONCENTRATIONS OF PREGNANT WOMEN

Excess chronic exposure of pregnant women to heavy metals is dangerous because it can pass across the placenta and damage organ systems of developing child who has not fully developed regulatory mechanisms. Exposure during pregnancy can cause harmful consequences on the fetus which are different from those to adults. For different metabolism of metals in a body of individual, the genetic polymorphisms of genes, which are part of glutathione system, are responsible.

In scope of our diploma work we have tried to estimate associations between *glutathione S-transferase mu 1* and *theta 1* gene deletion (*GSTM1**0 in *GSTT1**0) and *polymorphism in glutathione S-reductase intron 3* (*GSRint3* (A>G)) with metal concentrations in cord blood, maternal blood and maternal hair in samples of 212 pregnant women. Initially we multiplied target DNA sequences of *GSTM1* and *GSTT1* genes by using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) followed by electrophoresis. For determination of *GSRint3* (A>G) polymorphism we used PCR followed by restriction fragment length polymorphism and electrophoresis. We performed statistical analyses using the statistical software package PASW Statistics 18 (Release 18.0.0).

We have discovered that (marginally) statistical significant association is present between *GSRint3* (A>G) polymorphism and concentrations of lead in maternal blood ($p=0,044$) and cord blood ($p=0,095$). Women with genotype GG have lower concentrations of lead. We found that *GSTM1* gene deletion polymorphism is statistically significantly associated with higher values of lead in maternal ($p=0,004$) and cord blood ($p=0,051$). *GSTT1* gene deletion polymorphism is (marginally) statistically significantly associated with higher values of methylmercury in maternal hair ($p=0,090$), maternal blood ($p=0,077$) and cord blood ($p=0,028$). For combination of both deletion polymorphisms we have confirmed statistical significant association with lead concentrations in maternal blood ($p=0,029$) and if we included covariates, these was also shown for methylmercury in maternal hair, maternal blood and cord blood. Women with both gene deletions had the highest values of mentioned metals. Kruskal-Wallis non-parametric test showed that combination of deletion polymorphisms is statistically significantly related to higher cadmium concentrations in cord blood ($p=0,032$). Women with both gene deletions had the highest values of cadmium in cord blood.

We also found associations between mentioned genes alterations and concentrations of essential elements such as selenium and manganese. *GSRint3* (A>G) polymorphism is (marginally) statistically significant related to selenium concentrations in cord blood ($p=0,064$) and manganese in maternal blood ($p=0,035$). Women with genotype GG had lower concentrations of selenium and manganese. For *GSTM1* gene deletion polymorphism we found statistical significant association with higher values of manganese in maternal blood ($p=0,012$). For combination of both deletion polymorphisms we found marginally statistical significant association with manganese concentrations in maternal blood ($p=0,069$). Women with both gene deletions had the highest values of manganese.

On the base of our results we can conclude that *GSR*, *GSTM1* and *GSTT1* genes alterations are associated with heavy metal concentrations as well as with essential elements in blood and hair of pregnant women and cord blood. These findings can be used as predictive factor to sensitivity of children prenatal exposure to toxic metals.

SEZNAM OKRAJŠAV

ANCOVA	analiza kovarianc
ANOVA	analiza varianc
bp	bazni par
cCd	koncentracija kadmija v popkovnični (angl. <i>cord</i>) krvi
cHg	koncentracija živega srebra v popkovnični krvi
cMeHg	koncentracija metilživega srebra v popkovnični krvi
cMn	koncentracija mangana v popkovnični krvi
cPb	koncentracija svinca v popkovnični krvi
cSe	koncentracija selena v popkovnični krvi
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
GPX1	glutation peroksidaza 1
GSH	reducirana oblika glutaciona
GSR	encim glutacion reduktaza
GSSG	oksidirana oblika glutaciona
GSTM1	encim glutacion S-transferaza mu 1
GSTT1	encim glutacion S-transferaza theta 1
hHg	koncentracija živega srebra v lasih nosečnic
hMeHg	koncentracija metilživega srebra v lasih nosečnic
lncHg	logaritmirane vrednosti koncentracij živega srebra v popkovnični krvi
lncMeHg	logaritmirane vrednosti koncentracij metilživega srebra v popkovnični krvi
lncPb	logaritmirane vrednosti koncentracij svinca v popkovnični krvi
lnhHg	logaritmirane vrednosti koncentracij živega srebra v lasih nosečnic
lnhMeHg	logaritmirane vrednosti koncentracij metilživega srebra v lasih nosečnic
lnmCd	logaritmirane vrednosti koncentracij kadmija v krvi nosečnic
lnmHg	logaritmirane vrednosti koncentracij živega srebra v krvi nosečnic
lnmMn	logaritmirane vrednosti koncentracij mangana v krvi nosečnic
lnmPb	logaritmirane vrednosti koncentracij svinca v krvi nosečnic
mCd	koncentracija kadmija v krvi nosečnic oz. mater (angl. <i>maternal</i>)
mHg	koncentracija živega srebra v krvi nosečnic
mMeHg	koncentracija metilživega srebra v krvi nosečnic

mMn	koncentracija mangana v krvi nosečnic
mPb	koncentracija svinca v krvi nosečnic
mSe	koncentracija selena v krvi nosečnic
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNS	reaktivne dušikove spojine
ROS	reaktivne kisikove spojine
TAE	tris-acetat-EDTA

KAZALO SLIK

Slika 1: Kompleks MeHg in cisteina strukturno posnema aminokislino metionin.....	6
Slika 2: Prikaz stopenj v sintezi hema, ki jih inhibira svinec	8
Slika 3: Prikaz nefrotoksičnosti kadmija	8
Slika 4: Shematski prikaz transplacentarnega transporta.....	11
Slika 5: Sinteza glutationa in njegovih reakcij	16
Slika 6: Odsek introna 3 gena <i>GSR</i> , ki ga pomnožujemo s pomočjo PCR reakcije	30
Slika 7: Odsek gena <i>GSTMI</i> , ki ga pomnožujemo s pomočjo PCR reakcije.....	32
Slika 8: Odsek gena <i>GSTT1</i> , ki ga pomnožujemo s pomočjo PCR reakcije.....	32
Slika 9: Prikaz cepljenih fragmentov na 3% agaroznem gelu po izvedbi RFLP z ApaLI encimom.....	38
Slika 10: Del nukleotidnega zaporedja vzorca 100185.....	39
Slika 11: Del nukleotidnega zaporedja vzorca 100192.....	39
Slika 12: Vpliv polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) na koncentracijo mPb	42
Slika 13: Vpliv polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) na koncentracijo cPb.....	42
Slika 14: Prikaz produktov večkratne sočasne PCR reakcije na 2% agaroznem gelu.....	45
Slika 15: Vpliv delecijejskega polimorfizma <i>GSTMI</i> *0 na koncentracijo mPb	49
Slika 16: Vpliv delecijejskega polimorfizma <i>GSTMI</i> *0 na koncentracijo cPb.....	49
Slika 17: Vpliv delecijejskega polimorfizma <i>GSTT1</i> *0 na koncentracijo cMeHg.....	51
Slika 18: Vpliv delecijejskega polimorfizma <i>GSTT1</i> *0 na koncentracijo mMeHg	51
Slika 19: Vpliv delecijejskega polimorfizma <i>GSTT1</i> *0 na koncentracijo hMeHg.....	52
Slika 20: Vpliv kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov na koncentracijo mMeHg.....	53
Slika 21: Vpliv kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov na koncentracijo cMeHg.....	54
Slika 22: Vpliv kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov na koncentracijo hMeHg.....	54
Slika 23: Vpliv kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov na koncentracijo mPb	55
Slika 24: Vpliv polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) na koncentracijo cSe.....	59
Slika 25: Vpliv delecijejskega polimorfizma <i>GSTMI</i> *0 na koncentracijo mMn	61
Slika 26: Vpliv kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov na koncentracijo mMn	62

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Značilnosti elementarne, anorganske in organske oblike živega srebra.....	5
Preglednica II: Značilnosti anorganskih in organskih spojin svineca in anorganskih spojin kadmija.....	7
Preglednica III: Značilnosti anorganskih spojin selena in mangana	10
Preglednica IV: Pogostnost polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G).....	18
Preglednica V: Pogostnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i> polimorfizmov	20
Preglednica VI: Kandidatni geni, ki naj bi sodelovali v metabolizmu toksičnih kovin.....	21
Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNK.....	27
Preglednica VIII: Pogoji PCR reakcije za pomnoževanje introna 3 v <i>GSR</i> genu	27
Preglednica IX: Sestava zmesi enega vzorca za analizo RFLP	31
Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNK.....	35
Preglednica XI: Pogoji večkratne verižne reakcije s polimerazo	35
Preglednica XII: Prikaz značilnosti preiskovank.....	71
Preglednica XIII: Pogostnost preiskovanih polimorfizmov <i>GSRint3</i> (A>G), <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	72
Preglednica XIV: Rezultati genotipizacije	73
Preglednica XV: Povzetek rezultatov testa ANOVA za polimorfizem <i>GSRint3</i> (A>G).....	76
Preglednica XVI: Povzetek rezultatov LSD Post Hoc testa za polimorfizem <i>GSRint3</i> (A>G).....	76
Preglednica XVII: Povprečne vrednosti elementov glede na genotip GG, AG ali AA.....	77
Preglednica XVIII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se).....	78
Preglednica XIX: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv polimorfizma <i>GSRint3</i> (A>G) na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov	78
Preglednica XX: Povzetek rezultatov testa ANOVA za delecija polimorfizma <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i> ter kombinacijo obeh polimorfizmov.....	79
Preglednica XXI: Povzetek rezultatov LSD Post Hoc testa za delecija polimorfizma <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i> ter kombinacijo obeh polimorfizmov.....	79

Preglednica XXII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijekega polimorfizma <i>GSTM1*0</i> na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se)	80
Preglednica XXIII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijekega polimorfizma <i>GSTT1*0</i> na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se)	80
Preglednica XXIV: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv kombinacije obeh delecijeških polimorfizmov na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se)	81
Preglednica XXV: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijekega polimorfizma <i>GSTM1*0</i> na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov	81
Preglednica XXVI: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijekega polimorfizma <i>GSTT1*0</i> na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov	82
Preglednica XXVII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv kombinacije obeh delecijeških polimorfizmov na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov	82
Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti elementov glede prisotnost ali odsotnost delecijekega polimorfizma <i>GSTM1*0</i>	83
Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti elementov glede prisotnost ali odsotnost delecijekega polimorfizma <i>GSTT1*0</i>	84
Preglednica XXX: Povprečne vrednosti elementov za kombinacijo obeh delecijeških polimorfizmov <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	85

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečne vrednosti mPb in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za <i>GSRint3</i> (A>G) polimorfizem.....	42
Graf 2: Povprečne vrednosti cPb in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za <i>GSRint3</i> (A>G) polimorfizem.....	42
Graf 3: Povprečne vrednosti mPb za gen <i>GSTM1</i>	49
Graf 4: Povprečne vrednosti cPb za gen <i>GSTM1</i>	49
Graf 5: Povprečne vrednosti cMeHg za gen <i>GSTT1</i>	51
Graf 6: Povprečne vrednosti mMeHg za gen <i>GSTT1</i>	51
Graf 7: Povprečne vrednosti hMeHg za gen <i>GSTT1</i>	52
Graf 8: Povprečne vrednosti mMeHg in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	53
Graf 9: Povprečne vrednosti cMeHg in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	54
Graf 10: Povprečne vrednosti hMeHg in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	54
Graf 11: Povprečne vrednosti mPb in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	55
Graf 12: Povprečne vrednosti cCd in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	55
Graf 13: Povprečne vrednosti mMn in p-vrednost LSD Post Hoc testa za <i>GSRint3</i> (A>G) polimorfizem.....	58
Graf 14: Povprečne vrednosti cSe in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za <i>GSRint3</i> (A>G) polimorfizem.....	59
Graf 15: Povprečne vrednosti mMn za gen <i>GSTM1</i>	61
Graf 16: Povprečne vrednosti mMn in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	62

1 UVOD

1.1 Kovine

Kovine predstavljajo več kot tri četrtine vseh elementov periodnega sistema. Njihove fizikalne lastnosti so posledica posebnega tipa kemijske vezi, ki jo imenujemo kovinska vez. Poglavitne značilnosti kovin so: visok sijaj, dobra električna in toplotna prevodnost, visoka gostota in tališče, trdnost, mehanska razteznost in odpornost. V literaturi so kot človeku toksične kovine največkrat omenjene berilij (Be), kadmij (Cd), krom (Cr), svinec (Pb), živo srebro (Hg), nikelj (Ni) in metaloid arzen (As). Nekatere kovine so za človeka esencialne, mednje uvrščamo kobalt (Co), baker (Cu), železo (Fe), magnezij (Mg), mangan (Mn), cink (Zn), molibden (Mo), trivalentni krom (Cr) in nekovino selen (Se). V diplomski nalogi se bomo osredotočili na toksične kovine kot so kadmij, svinec in živo srebro. Vključili bomo tudi selen in mangan, ki spadata med esencialne elemente.

Če izvzamemo poklicno izpostavljenost, je splošna populacija kovinam najbolj izpostavljena preko hrane, vode in zraka. V mestnih in industrializiranih območjih je onesnaženo ozračje poglavitni razlog izpostavljenosti kovinam. Kontaminirana voda je problem v geografskih območjih, kjer so kovine naravno prisotne v zemlji in rudninah. Onesnaženost zraka, zemlje in vodnih sistemov lahko posledično privede do kritičnih koncentracij kovin v rastlinski in živalski hrani in tako vzdolž prehranjevalne verige do človeka. Kovine za razliko od ostalih sinteznih snovi niso ustvarjene niti odstranjene s človekovim delovanjem, industrijska dejavnost je le skoncentrirala njihovo prisotnost v biosferi (1).

Absorpcija kovin je najpogostejša preko kože, dihal in prebavil. Ali bodo delci prispeli v stik s pljučno površino, je odvisno od velikosti, oblike in gostote delcev (aerodinamični premer združuje vse tri omenjene lastnosti). Velikost delcev je osnovnega pomena, ker vpliva na kraj in stopnjo nalaganja. Nevarnejši so manjši delci, saj prodrejo globlje v respiratorni trakt in se lažje absorbirajo v sistemski krvni obtok kot večji. Na živalskih modelih so dokazali, da kovine v velikosti nanodelcev lahko preko olfaktorne sluznice v nosu preidejo do olfaktornega živca v možganih. Absorpcija iz prebavil poteka s pasivno

difuzijo ali s pomočjo transportnih proteinov. Anorganske soli kovin so slabo lipidotopne, zato je absorpcija s pasivno difuzijo majhna. Skozi nepoškodovano kožo se bolje absorbirajo lipidotopne molekule. Absorpcija je povečana pri vneti in poškodovani koži. Preko kože najlažje prehajajo organokovinske spojine.

Na hitrost in obseg **porazdelitve** kovin v telesu vplivajo kemijska oblika, v kateri se kovina nahaja v krvi, vezava na plazemske proteine, zmožnost prehoda kovine iz krvi v tkivo, hitrost perfuzije organa in afiniteta do tkivnih proteinov. Toksične kovine se lahko vežejo na proteine, ki sodelujejo pri prenosu esencialnih kovin.

Ko govorimo o **presnovi** kovin, so mišljene spremembe oksidacijskega stanja in tvorba ali razpad vezi. V prebavilih lahko črevesna mikroflora metilira ali demetilira kovino, kar vpliva na absorpcijo in izločanje.

Glavna pot **eliminacije** kovin poteka preko ledvic in prebavnega trakta. Kovine lahko s pasivnim ali aktivnim prenosom preko membran črevesnih celic preidejo v lumen in se izločijo s fecesom. Za črevesne celice je značilno, da se hitro obnavljajo in delež vnesenih kovin se skupaj s propadlimi celicami izloči še pred absorpcijo. Kovine, ki se izločajo z žolčem, se v določeni meri lahko reabsorbirajo v procesu enterohepatičnega kroženja. Pri izločanju preko ledvic se kovine, raztopljene v obliki ionov ali vezane na nizkomolekularne plazemske proteine, prefiltrirajo skozi glomerulno membrano v tubularno tekočino. Nekatere kovine se lahko v ledvičnih tubulih ponovno absorbirajo, zato se le majhen delež izloči z urinom. Tudi luščenje tubulnih celic poveča izločanje kovin iz telesa (2).

Toksikološko pomembna lastnost kovin je, da lahko z izgubo enega ali več elektronov tvorijo katione, ki lahko reagirajo z biološkimi sistemi. V nadaljevanju so opisani osnovni mehanizmi toksičnosti kovin, ki so natančneje raziskani na molekularnem nivoju:

- prenos toksičnih kovin v celico preko transportnih mehanizmov za endogene snovi: nizka selektivnost transportnih sistemov za endogene snovi omogoča toksičnim kovinam, da izrabijo iste transportne poti kot esencialne kovine.
- posnemanje in zamenjava esencialnih kovin: toksične kovine lahko v biološko pomembnih molekulah po principu mimikrije nadomestijo esencialne kovine.
- vezava na peptide in proteine: metalotionein in glutation sta najpomembnejši molekuli, ki vežeta kovine in s tem omejita njihovo razpoložljivost. S tem sicer

toksičnost zmanjšata, vendar jo po drugi strani lahko tudi povečata. Metalotioneini so s cisteinom bogati proteini in z vezavo kovin podaljšajo čas zadrževanja kovine (biološki razpolovni čas je daljši), kar lahko vodi v kronične učinke. Kovine lahko inducirajo njihovo sintezo. Po drugi strani delujejo antioksidativno, saj se lahko cistein ob prisotnosti oksidantov oksidira do cistina. Vloga glutationa v metabolizmu kovin je natančneje opisana v poglavju 1.5. Kovine lahko reagirajo še z mnogimi peptidi in proteini ter s spremembo prostorske strukture vplivajo na njihovo aktivnost.

- mutageni in genotoksični učinki: večina kovin je šibko mutagenih in v majhni meri učinkujejo neposredno na genetski material.
- epigenetski učinki: epigenetske spremembe pomenijo spremembe v izražanju genov, pri čemer se zaporedje DNK ne spremeni. Dobro so proučeni procesi metilacije DNK ter modifikacije histonov, kot so acetiliranje, fosforiliranje, metiliranje, sumoiliranje (pripenjanje SUMO proteinov - angl. *Small Ubiquitin-like Modifier proteins*), ADP-riboziliranje, ubikvitiniranje. Hipometilacija vodi do aktivacije onkogenov in kromosomske nestabilnosti, hipermetilacija pa do utišanja tumor supresorskih genov. Modifikacije histonov vplivajo na regulacijo transkripcije genov. Omenjene spremembe sodelujejo pri procesu tumorogeneze.
- vpliv na celične signalne poti in izražanje genov: kovine lahko sprožijo signalne poti, ki vplivajo na izražanje genov in s tem povezano kancerogenezo. Primeri signalnih poti, ki jih lahko sprožijo kovine, so: nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS); aktivacija z mitogenom aktiviranih protein kinaz (MAPK), ki imajo vlogo pri celični rasti, proliferaciji, diferenciaciji, apoptozi in transformaciji; aktivacija poti, ki imajo pomembno vlogo v procesu kancerogeneze (npr. signalna pot fosfatidil inozitol 3 kinaze (PI3K); jedrnega faktorja kappa B (NF- κ B); faktorja, ki se inducira s hipoksijo (HIF-1)) (2).

1.2 Toksične kovine

V literaturi so kot človeku toksične kovine največkrat omenjene berilij (Be), kadmij (Cd), krom (Cr), svinec (Pb), živo srebro (Hg), nikelj (Ni) in metaloid arzen (As).

Pomembni faktorji, ki določajo resnost vpliva na zdravje pri izpostavitvi kovinam so: odmerek, pot vnosa, trajanje in pogostnost izpostavljenosti, kemijska oblika kovine (elementarna, anorganska, organska oblika ali kovinski kompleksi), fizikalne lastnosti kovinskih delcev (velikost, oblika, topnost), biološka razpolovna doba kovine in lastnosti izpostavljene osebe (starost, spol, poklic, prehranjenost, genetski vplivi, pridružene bolezni, kajenje, uživanje alkohola, itd.) (1).

V preteklosti so bile pogostejše **akutne** zastrupitve, ki so danes redke. Za akutne zastrupitve je značilno hitro spreminjanje klinične slike, zato je spremljanje vitalnih funkcij odločilnega pomena. Ob izpostavljenosti param ogroženo osebo premestimo v prostor s čistim zrakom. Ob zaužitju poskušamo spodbuditi bruhanje in po potrebi opravimo izpiranje želodca, da preprečimo nadaljnjo absorpcijo. Kovine, ki so podvržene enterohepatičnemu kroženju, podaljšajo trajanje zastrupitve. V takšnih primerih lahko s ponavljajočimi odmerki aktivnega oglja prekinemo ponovno resorpcijo. Pri hudih zastrupitvah se uvedejo zahtevnejše eliminacijske metode (hemodializa, hemoperfuzija, plazmafereza).

Danes je v ospredju zanimanje za **kronično** izpostavljenost, katere neizraziti učinki so težje prepoznavni in drugačni od tistih ob kratkotrajni visoki izpostavljenosti.

Za spodbujanje izločanja kovin iz telesa se uporabljajo kelatorji (npr. kalcijev-dinatrijev edetat, dimerkaprol, dimerkaptosukcinska kislina, dimerkaptopropansulfonska kislina), ki s kovinami tvorijo komplekse in povečajo njihovo izločanje. Večina kelatorjev je nespecifičnih in lahko eliminirajo tudi esencialne kovine. Pomembno je, da imajo večjo afiniteto do kovin, kot do endogenih ligandov. Potrebna je previdnost pri izbiri pravega kelatorja, saj niso vsi primerni za zdravljenje ob zastrupitvah s kovinami. Tako je na primer dimerkaprol kontraindiciran pri zastrupitvah z železom, kadmijem, selenom ali uranom, ker z njimi tvori bolj toksične produkte, kot so kovine same.

Kelatorji imajo veliko neželenih učinkov, ki ob neustrezni izbiri lahko celo poslabšajo stanje. Kelacijska terapija sicer ublaži simptome in pospeši izločanje kovin z urinom,

vendar ni učinkovita pri eliminaciji kovin, ki se akumulirajo na težje dostopnih mestih (npr. osrednje živčevje) in ne vpliva na izboljšanje nevrološke klinične slike.

Trenutno torej nimamo učinkovitega zdravljenja, s katerim bi uspešno odpravili posledice zastrupitve z kovinami, zato je potrebno izvajanje preventivnih programov in osveščanje prebivalstva (izobraževanje in redni zdravstveni pregledi poklicno izpostavljenih ljudi; uvedba zakonskih predpisov maksimalno dovoljenih vrednosti v pitni vodi, hrani in okoljskem zraku; opozarjanje posebno občutljivih populacij (otroci, ženske v rodni dobi) na tvegano izpostavljenost kovinam; zmanjšanje emisij v okolje) (3).

Preglednica I in **Preglednica II** prikazujeta vire izpostavljenosti, toksikokinetiko, zmožnost prehoda preko placente in toksikodinamiko kovin, ki jih natančneje obravnavamo v diplomski nalogi, glede na njihovo kemijsko obliko.

1.2.1 Živo srebro

Preglednica I: Značilnosti elementarne, anorganske in organske oblike živega srebra.

Živo srebro			
Kemijska oblika	anorganske spojine		organske spojine
	elementarno živo srebro (Hg ⁰)	Hg ¹⁺ in Hg ²⁺ soli	metilživo srebro (MeHg)
Viri izpostavljenosti	-naravni izvor: vulkanski izbruhi, živosrebrove rude, izhlapevanje iz površine zemeljske skorje in oceanov -antropogeni izvor: baterije, termometri, elektronska oprema, amalgam, pesticidi, medicinski pripomočki, termoenergetski objekti (izgorevanje fosilnih goriv), cementarne, rudniki, talilnice, uživanje hrane (predvsem rib, ki vsebujejo MeHg), konzervans tiomersal (EtHg) v cepivih		
Toksikokinetika	A: preko pljuč: ~80%, A: preko prebavil (npr. tekočega Hg ⁰ , ki je v termometrih): 0,01% D: centralni živčni sistem M: oksidacija do Hg ²⁺ s pomočjo katalaze E: ~10% z dihanjem -preostali del, ki se pretvori v Hg ²⁺ se izloči z urinom ter fecesom	A: preko prebavil: 7-15% D: ledvice, jetra M: -vezava na –SH skupine -manjši delež se reducira do Hg ⁰ (mehanizem pretvorbe je slabo raziskan) -v naravi poteka metilacija s pomočjo mikroorganizmov E: -pretvorba konjugatov (GS-Hg-SG ali Cys-S-Hg-S-Cys) do Hg ²⁺ , ki se nato izloči z urinom ter fecesom -majhen delež, ki se pretvori v Hg ⁰ se izloči z dihanjem	A: preko prebavil: ~95% D: centralni živčni sistem M: -vezava na –SH skupine -demetilacija do anorganske oblike s pomočjo encimov gastrointestinalne mikroflore ali citokrom P-450 encimov E: -enterohepatično kroženje -pretvorba konjugatov (MeHg-SG ali MeHg-S-Cys) do Hg ²⁺ , ki se nato izloči z urinom (~10%) ter fecesom (~90%)
Prehod preko placente	da	v majhni meri	da
Toksikodinamika	nevrotoksičnost (Slika 1)	nefrotoksičnost	nevrotoksičnost (Slika 1)
Reference	1, 4		

Razlaga okrajšav: **A**, absorpcija; **D**, distribucija; **M**, metabolizem; **E**, eliminacija.

Za zastrupitev z MeHg je značilna nevrotoksičnost (**Slika 1**). MeHg se veže na sulfhidrilne skupine cisteina, pri čemer nastane kompleks (MeHg-S-Cys), ki je strukturno podoben metioninu in lahko preko aminokislinskih prenašalcev preide krvno-možgansko pregrado (11).



kompleks MeHg in cisteina



metionin

Slika 1: Kompleks MeHg in cisteina strukturno posnema aminokislino metionin.

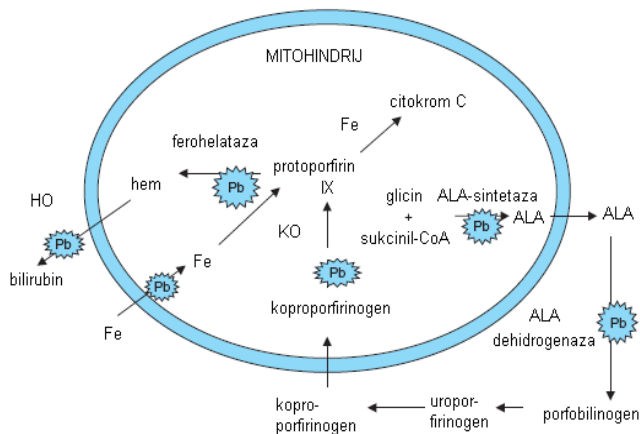
1.2.2 Svinec in kadmij

Preglednica II: Značilnosti anorganskih in organskih spojin svineca in anorganskih spojin kadmija (značilnosti organskih spojin kadmija niso prikazane, ker so redke in se v naravi hitro razgradijo).

Kemijska oblika	Svinec		Kadmij
	anorganska oblika (Pb ²⁺ in Pb ⁴⁺ soli)	organska oblika (Me ₄ Pb, Et ₄ Pb)	anorganska oblika (Cd ¹⁺ in Cd ²⁺ soli)
Viri izpostavljenosti	-onesnažen zrak: v okolici akumulatorskih tovarn, varilnic, rudnikov svineca; poraba osvinčenega bencina (predvsem v državah tretjega sveta, medtem ko je v razvitejših državah njegova poraba močno upadla) -hrana: pridelki ga lahko vsrkavajo iz vode, kontaminirana moka iz domačega mlina (svinčeni ležaji), prehajanje iz materialov, ki so v stiku s hrano -voda: svinčene vodovodne cevi -ostali izdelki: nakit, baterije, nezadostno žgane keramične posode, strelivo, stare otroške svinčene igrače, zaščitni premazi in barve, insekticidi, kozmetični izdelki iz manj razvitih držav, prekomerne koncentracije so našli tudi v nekaterih ajuverdskih zeliščnih pripravkih		-onesnažen zrak: v okolici talilnic (kadmij je stranski proizvod pri taljenju cinka in svineca), cigaretne dim -hrana: lupinarji, žitarice -voda: največkrat je kontaminirana voda za namakanje riža, pšenice in tobaka -ostali izdelki: Ni-Cd baterije, barve, plastika, zlitine, gnojila, pesticidi
Toksikokinetika	A: preko prebavil: 37-70% (pri otrocih je višja kot pri odraslih) D: visoka afiniteta do ALAD (Slika 2), jetra, ledvice, centralni in periferni živčni sistem, kosti, zobje in lasje M: ni dokazov za metilacijo ali drugih biotransformacijskih reakcij E: preko ledvic, preko žolča (domnevno v obliki kompleksa z glutationom) v feces	A: preko kože, dihal in prebavil D: jetra, živčevje, skelet, ledvice M: dealkilacija do R ₃ Pb, R ₂ Pb in anorganske oblike z encimi citokrom P-450 E: z urinom v obliki R ₃ Pb, R ₂ Pb, Pb ²⁺	A: preko prebavil: 5-10% A: preko pljuč: 10-50% D: jetra, ledvice M: vezava na plazemske proteine in metalotioneine E: preko ledvic, izločanje preko žolča (v obliki kompleksa z glutationom) v feces
Prehod preko placent	da	da	v majhni meri
Toksikodinamika	nevrotoksičnost, periferna motorična nevropatija, nefropatija, hipertenzija, anemija, imunotoksičnost, osteoporoza, gametotoksičnost	nevrotoksičnost, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost	nefrotoksičnost (Slika 3), osteoporoza, obstruktivna pljučna bolezen, bolezen <i>Itai-Itai</i> , nevrotoksičnost
Reference	1, 5, 6		1, 7

Razlaga okrajšav: **A**, absorpcija; **D**, distribucija; **M**, metabolizem; **E**, eliminacija; **ALAD**, encim δ-aminolevulonol dehidrataza.

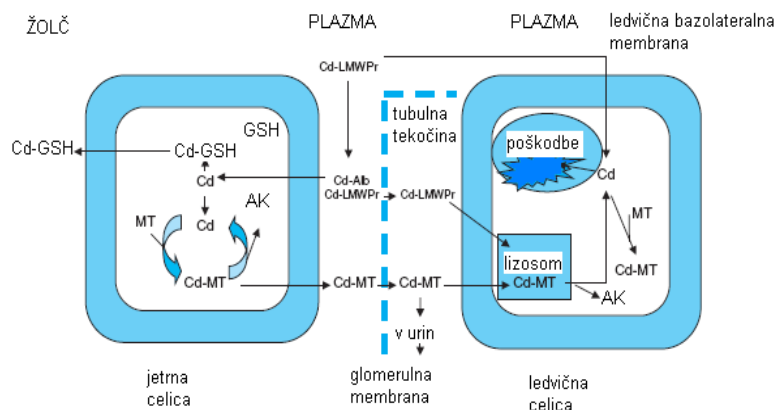
Za svinec je natančneje proučen mehanizem zaviranja sinteze hema (**Slika 2**), ki posledično vodi v anemije. Glavni mesti inhibicije sta na stopnji δ -aminolevulonat dehidrataze (angl. *δ -aminolevulinic acid dehydrogenase* - ALAD) in ferohelataze. ALAD katalizira povezavo dveh molekul aminolevulinske kisline (angl. *δ -aminolevulinic acid* - ALA) v porfobilinogen. Ferohelataza katalizira vključitev železa v protoporfirinski obroč, pri čemer nastane hem. Inhibicija ALAD in ferohelataze povzroči kopičenje ALA ter protoporfirina IX. V urinu najdemo povišane vrednosti porfirinov, koproporfirinov in δ -aminolevulinske kisline (1).



Slika 2: Prikaz stopenj v sintezi hema, ki jih inhibira svinec (1).

Razlaga okrajšav: **ALA**, aminolevulanska kislina; **HO**, hem oksidaza; **KO**, koproporfirinogen oksidaza; **Pb**, mesta, kjer se v metabolizmu vpleta Pb (predvsem dvovalentna oblika)

Glavna tarčna organa kadmija sta jetra in ledvice. V jetrih je večinoma shranjen v obliki kadmij-metalotionein (Cd-MT) kompleksov (**Slika 3**). V tej obliki lahko po krvi pride do ledvic, kjer se absorbira v celice proksimalnih tubulov. Tu se Cd-MT kompleksi razgradijo v lizosomih in lokalno sproščeni "prosti" kadmij ponovno inducira nastanek MT ali povzroči ledvično okvaro. Toksičen je predvsem za tubulne celice in glomerule (1).



Slika 3: Prikaz nefrotoksičnosti kadmija (1).

Razlaga okrajšav:
AK, aminokislina;
Cd-Alb, kadmij-albumin;
Cd-LMWPr, kadmij vezan na nizkomolekularne proteine;
Cd-GSH, kompleks kadmija z glutationom (v primeru dvovalentne oblike: GS-Cd-GS);
MT, metalotionein.

1.3 Esencialni elementi

Nekatere kovine so nujno potrebne za normalno delovanje organizma. Uvrščamo jih med esencialne (oligo)elemente, ker so potrebne v zelo majhnih količinah in jih moramo dobiti iz zunanjih virov, saj jih telo ni zmožno sintetizirati. Homeostatski mehanizmi morajo biti zelo natančno regulirani, saj tudi presežene koncentracije esencialnih elementov lahko zmanjšajo koncentracije drugih esencialnih elementov (2).

Njihova poglavitna funkcija je kataliza encimskih reakcij, pri kateri sodelujejo na naslednje načine:

- s pomočjo koordinacijskih kovalentnih vezi držijo substrat v pravilni usmeritvi, da se lahko veže na točno določen položaj v aktivnem mestu,
- pospešijo reakcijo s polarizacijo vezi, ki se bo razcepila ali stabilizirajo intermediat,
- sodelujejo pri prenosu elektronov med kovinskimi ioni in substratom pri oksidoredukcijskih reakcijah.

Kovinske ione potrebuje za svoje delovanje približno 30% vseh znanih encimov (t.i. metaloencimi). Običajno vsak encim potrebuje zanj specifičen kovinski ion. V primeru, da ta ion ni prisoten ali ga nadomesti drug, encim izgubi svojo aktivnost ali pa se mu le - ta močno zmanjša (8).

V literaturi so kot esencialni elementi za človekovo zdravje največkrat omenjeni baker (Cu), kobalt (Co), krom (Cr), železo (Fe), magnezij (Mg), mangan (Mn), molibden (Mo), cink (Zn) in selen (Se).

V diplomsko nalogo smo vključili selen in mangan, ki posredno sodelujeta v antioksidantnih procesih. **Selen** spada med nekovine, vendar imajo nekatere oblike kovinske lastnosti. Pri človeku je bilo do danes odkritih 25 selenoproteinov, med katerimi so tudi encimi, ki sodelujejo pri obrambi pred oksidativnim stresom (npr. glutacion peroksidaza, tioredoksin reduktaza). **Mangan** sestavlja številne metaloencime (piruvat karboksilaza, glutamin sintetaza, Mn-superoksid dismutaza, arginaza) in sodeluje kot kofaktor v mnogih encimskih reakcijah. V **Preglednici III** so povzete značilnosti anorganskih spojin selena in mangana. Organske spojine so redke, zato niso opisane.

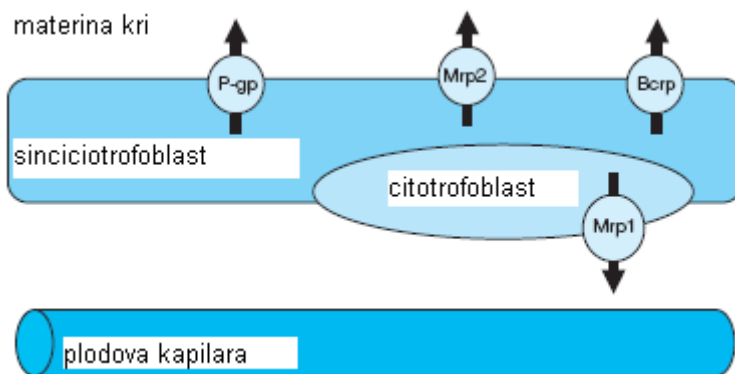
Preglednica III: Značilnosti anorganskih spojin selena in mangana.

	Selen	Mangan
Kemijska oblika	anorganska oblika (Se⁰, Se²⁺, Se⁴⁺ in Se⁶⁺ soli)	anorganska oblika (Mn²⁺, Mn⁴⁺ in Mn⁷⁺ soli)
Viri izpostavljenosti	-hrana: morska hrana, meso, mlečni izdelki in žitarice -onesnažen zrak: poraba premoga in fosilnih goriv, sežiganje gum, mletje žita, taljenje kovin -ostalo: vulkanske kamnine, komunalni odpadki, tobak	-hrana: zelenjava, žitarice, sadje, oreški in nekateri čaji -onesnažen zrak: rudniki, talilnice manganovega dioksida, proizvodnja stekla, baterij, kalijevega permanganata (KMnO ₄) in pesticidov
Toksikokinetika	A: Se ⁴⁺ , Se ⁶⁺ in selenometionin preko prebavil: ~80% ali več, medtem ko sta topnost in absorpcija Se ⁰ , Se ²⁺ zelo majhni D: živčevje, jetra, ledvice, endokrine žleze M: -redukcija s pomočjo GSH do H ₂ Se -pretvorba do selenofosfata s SEPHS, ki sodeluje pri sintezi selenoproteinov -metilacija z metiltransferazami -tvorba kompleksov z drugimi kovinami E: pretežno v obliki metiliranih metabolitov z urinom in fecesom; v primeru akutne zastrupitve se selen izloča tudi z dihanjem (značilen zadah po česnu)	A: preko prebavil: ~1-5% D: v tkivih, bogatih z mitohondriji (trebušna slinavka, jetra, ledvice, prebavila) M: oksido-redukcijske reakcije E: izločanje preko žolča v feces
Prehod preko placent	da	da
Toksikodinamika	-prekomerna izpostavljenost: nevrološki in dermalni učinki (izguba las in nohtov, spremenjena barva zob) -pomanjkanje: Keshonova bolezen (endemska kardiomiopatija), poslabšano delovanje imunskega sistema, povečana dovzetnost za raka in infekcijske ter vnetne bolezni	-prekomerna izpostavljenost: nevrotoksičnost, respiratorne bolezni, hipotenzija -pomanjkanje je bilo dokazano na živalskih modelih (motnje v rasti, razvoju kosti, zmanjšana reproduktivna funkcija)
Reference	1, 9	1, 10

Razlaga okrajšav: **A**, absorpcija; **D**, distribucija; **M**, metabolizem; **E**, eliminacija; **SEPHS**, selenofosfat sintetaza.

1.4 Transplacentarni transport

Izmenjavo plinov, hranilnih snovi in odpadnih produktov med materjo in plodom omogoča placenta. Toksične snovi, prisotne v materinem krvnem obtoku, lahko preidejo preko placente, pri čemer morajo premagati placentino pregrado (**Slika 4**), ki jo tvorijo apikalna in bazolateralna membrana sinciotrofoblasta, plast citotrofoblastnih celic ter endotelijske celice plodovih kapilar. S pasivno difuzijo najlažje prehajajo lipofilne snovi, ki niso ionizirane. Aktivni transport (proti koncentracijskemu gradientu) poteka s pomočjo prenašalcev, ki se nahajajo na materini ali plodovi strani. Možen je tudi prehod z olajšano difuzijo, ki je značilen za snovi, ki so strukturno podobne endogenim spojinam. Placenta ima tudi biotransformacijske zmožnosti, ki lahko toksinom preprečijo dostop do ploda. Natančen mehanizem prehoda kovin preko humane placente še ni razjasnen (11).



Slika 4: Shematski prikaz transplacentarnega transporta.

Transportni proteini (**P-gp**: P-glikoprotein, **Mrp 1**: protein povezan z resistenco na več spojin tipa 1 (angl. *multiresistant drug protein 1*), **Mrp 2**: protein povezan z resistenco na več spojin tipa 2 (angl. *multiresistant drug protein 2*), **Bcrp**: rezistenten protein izoliran pri raku na dojki (angl. *breast cancer resistance protein*)).

1.4.1 Prenatalna izpostavljenost toksičnim kovinam

V prenatalnem, neonatalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju je povečana občutljivost organizma za kovine in ostale ksenobiotike, ker organski sistemi še niso dokončno razviti. Občutljivost zarodka na toksične snovi je odvisna tudi od materine zmožnosti izločanja ksenobiotikov, pri čemer imajo pomembno vlogo genetski polimorfizmi encimov. S prekomerno prenatalno izpostavljenostjo kovinam povezujejo zmanjšano plodnost in neplodnost, intrauterino zaostajanje v rasti, spontane splave, različne malformacije (anencefalija, defekti oči, razklano nebo, skeletne nepravilnosti), napake ob rojstvu, postnatalno smrt, slabše intelektualne sposobnosti in motnje v razvoju živčnega sistema. Mehanizem nastanka razvojnih napak, ki jih povzročajo kovine, povezujejo z motnjami v proliferaciji, diferenciaciji in migraciji celic, celični smrti, biosintezi ter povezavami celica-celica ali tkivo-tkivo (12). S poskusi na živalih so pokazali, da je absorpcija pri novorojenih in mladih živalih večja kot pri odraslih, kar naj bi bilo povezano z višjo pinocitotno aktivnostjo in prepustnostjo še nedozorelega mladega epitelija (2).

- Vpliv **živega srebra** na fetalni razvoj, je dobro proučen, saj je v letih med 1950 in 1960 na območju zaliva Minamata na Japonskem zaradi izpustov odpadnih voda iz bližnje tovarne acetaldehida, prišlo do množične zastrupitve z MeHg, ki se je akumuliral v ribah. Matere so izkazovale le blage simptome ali celo nobenih, vendar so rodile novorojenčke z t.i. fetalno obliko minamatske bolezni. Prvi znaki, kot so nestabilnost vratu, konvulzije in nezmožnost sledenja oči, so se pojavili v šestem mesecu po rojstvu, sledila je vrsta nevroloških nepravilnosti, duševne in motorične motnje, ki so se izraziteje pokazale z rastjo in razvojem. Učinki MeHg na otrokov razvijajoči in na izoblikovani centralni živčni sistem odraslih so različni. Pri odraslih so značilne poškodbe v določenih možganskih regijah, medtem ko so ob prenatalni izpostavljenosti poškodbe bolj generalizirane. Po *in utero* izpostavljenosti je bila opažena manjša velikost možganov in lobanje ter porušena citoarhitektura centralnega živčevja. Koncentracije v možganih fetusov so bile višje kot v ostalih njihovih tkivih in pogosto tudi višje kot v možganih mater. Mehanizem poškodb še ni natančno raziskan. Znani so tudi primeri zastrupitve z žitaricami, zaradi uporabe fungicida, ki je vseboval MeHg (1, 13, 14).

Elementarnemu živemu srebru (Hg^0) so nosečnice izpostavljene predvsem zaradi amalgamskih zalivk. Ugotovljena je bila korelacija med številom amalgamskih zalivk mater in koncentracijo živega srebra pri obdukciji fetusov (12).

Zanimiv je primer 27 letne ženske, ki je zaradi poskusa samomora z intravensko injiciranim živim srebrom, imela zelo visoke koncentracije živega srebra v krvi (približno 600-krat višje kot so povprečne vrednosti populacije ZDA) in urinu (okoli 500-krat višje) ter je kljub temu rodila zdravega otroka (15).

- Vrednosti **svinca** okrog $100 \mu\text{g/L}$ v krvi mater, povezujejo s povečanim tveganjem za nosečniško hipertenzijo, spontane splave in vedenjske motnje otrok. Pri otrocih se klinični znaki encefalopatije pokažejo pri krvnih koncentracijah $70 \mu\text{g/dL}$ ali več, in sicer kot letargija, bruhanje, razdraženost, izguba apetita, ataksija vse do motenj zavesti, kome in smrti. Pri obdukcijah so bili ugotovljeni edem, poškodbe nevronske celice in razrast glia celic. Kljub znižanju krvnih koncentracij svinca so pogosto prisotne posledice, kot so epilepsija, mentalna zaostalost in v nekaterih primerih optična nevropatija in slepota (1). Še višje vrednosti naj bi povzročile intrauterino zaostajanje v rasti in kongenitalne malformacije. Vendar visokih koncentracij svinca v krvi ne spremlja vedno klinična slika zastrupitve. Študija izvedena v Zambiji, blizu rudnika in talilnice svinca, je pokazala povprečno krvno koncentracijo svinca $412 \mu\text{g/L}$ pri materah in $370 \mu\text{g/L}$ pri otrocih, s signifikatno korelacijo ($r=0,77$; $p<0,001$). Kljub temu ni bilo opaženega vpliva na porodno težo ali vrednosti eritrocitov (12).

Več študij je pokazalo, da so bile koncentracije svinca v krvi mater večinoma višje kot v popkovnični krvi ali krvi novorojenčkov, kljub višji afiniteti plodovega hemoglobina do svinca. Koncentracija svinca v krvi med nosečnostjo zaradi povišanja volumna krvi in plazme sprva pade, nato pa se ob mobilizaciji iz kosti, kjer je bil naložen dolga leta, sprosti v krvni obtok in tako njegova koncentracija naraste. Opisani proces se dogaja tudi med laktacijo in menopavzo (6).

- Podatki o koncentracijah **kadmija** v materini krvi, v krvi placente in ploda so pokazali, da se kadmij v placenti akumulira in doseže plod v količinah, ki jih je možno detektirati. Kadilke so rodile otroke z nižjo porodno težo, v primerjavi z nekadilkami, vendar je vzrok za nižjo težo težko interpretirati zgolj zaradi kadmija, katerega vrednosti so pri kadilkah višje (12). Lagerkvist in sod. so izmerili sledeče srednje

vrednosti kadmija v placentah: 2,6 ng/g pri nekadilkah; 3,6 ng/g pri bivših kadilkah in 5,0 ng/g pri kadilkah. Vrednosti v placenti so bile štirikrat višje kot krvi matere (7). Več raziskav je pokazalo, da so višje koncentracije kadmija poleg nižje porodne teže povezane tudi s prezgodnjimi porodi in motnjami v nevrološkem razvoju otrok (16, 17).

- **Selen** prehaja preko placente in se izloča v mleko. Koncentracije v mleku so odvisne od vnosa s hrano (1). Na živalih so bili dokazani teratogeni učinki visokih koncentracij selena in njegovih spojin. Pri ljudeh, kljub visokim vnosom selena v nekaterih regijah Kitajske, ni bilo opaženih teratogenih učinkov. Zaradi zelo majhnega vnosa selena s hrano je bila pri nosečnicah in otrocih (na Kitajskem) ugotovljena Keshanova bolezen (9). Mistry in sod. so v raziskavi ugotovili nižje koncentracije selena in zmanjšano aktivnost glutathion peroksidaze v času nosečnosti. Vrednosti so bile še nižje pri nosečnicah s preeklampsijo. Ob pomanjkanju selena, glutathion peroksidaza ne more optimalno delovati, kar privede do oksidativnega stresa in možnosti pojava nosečnostne hipertenzije (18).
- **Mangan** je nujno potreben za normalen prenatalni in neonatalni razvoj, saj ima pomembno vlogo pri mineralizaciji kosti, imunski obrambi, metabolizmu proteinov, maščob in ogljikovih hidratov ter ščiti pred poškodbami radikalov. Prehaja preko placente in se izloča v mleko. Na živalskih modelih je bilo pomanjkanje mangana povezano z motnjami v rasti, razvoju kosti, metabolizmu ogljikovih hidratov in maščob ter zmanjšano reproduktivno funkcijo, medtem ko je presežek mangana izzval nevrološke, reproduktivne in respiratorne motnje. O vplivu pomanjkanja ali previsokih koncentracij na razvijajoči plod pri ljudeh je malo podatkov (10). Znižane koncentracije mangana v materini krvi nakazujejo na intrauterino zaostajanje v rasti in nižjo porodno težo, vendar so za razjasnitev vpliva mangana na izid rojstva potrebne nadaljnje raziskave (19).

K različnim toksikološkimi odzivom posameznika na obremenjenost s kovinami pomembno prispeva genska variabilnost, najpogosteje v genih za presnovne encime, prenašalne in tarčne proteine. Genske spremembe, ki upočasnijo presnovo kovin, vodijo v kopičenje kovin in hitrejše doseganje toksičnih učinkov.

1.5 S toksičnimi kovinami inducirani oksidativni stres in glutationski antioksidantni obrambni sistem v bioloških procesih

Kadar se dinamično ravnovesje med oksidanti in antioksidanti prevesi na stran oksidacijskih procesov in je koncentracija antioksidantov nižja oz. je aktivnost antioksidantnih encimov zmanjšana, govorimo o oksidativnem stresu. Le-ta skupaj z drugimi dejavniki pripomore k razvoju patoloških (Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, rak, ateroskleroza, sladkorna bolezen, revmatoidni artritis) in fizioloških procesov (staranje). Po drugi strani so nekateri radikali nujno potrebni za aktivacijo specifičnih fizioloških signalnih poti in zato ne smejo biti v celoti odstranjeni. Primeri »koristnih« radikalog, ki v telesu stalno nastajajo so NO, ciklični endoperoksidi in levkotrieni.

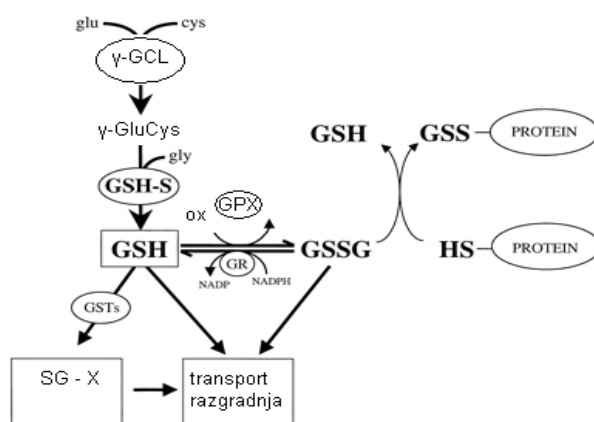
Reaktivne zvrsti, med katerimi so najpogostejše reaktivne kisikove spojine (angl. *reactive oxygen species* - ROS) in reaktivne dušikove spojine (angl. *reactive nitrogen species* - RNS), lahko razvrstimo v **radikalske** (npr. superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni radikal (ROO^{\cdot}), alkoksilni radikal (RO^{\cdot})) in **neradikalske** (npr. vodikov peroksid (H_2O_2), hidroperoksid (ROOH), hipoklorna kislina (HClO), ozon (O_3)). Nenadzorovano povzročijo epigenetične (poškodbe strukturnih in funkcijskih molekul celic) ali genotoksične (poškodbe nukleinskih kislin) spremembe celic.

Eden izmed mehanizmov toksičnosti kovin temelji na povzročitvi oksidativnega stresa, ker povečajo nastanek reaktivnih zvrsti, kar zniža nivo glutationa in ostalih antioksidantov. Delujejo tudi na encime, saj lahko vplivajo na metabolizem esencialnih kovin, ki so kofaktorji nekaterih antioksidantnih encimov (Cu, Zn – superoksidna dismutaza, Se – glutation peroksidaza, Fe – katalaza). Poleg tega povečajo lipidno peroksidacijo celičnih membran, povzročijo oksidativne poškodbe DNK, kar posledično privede do apoptoze.

Evolucijsko smo razvili različne mehanizme za obrambo pred oksidativnim stresom, ki jih v grobem lahko razdelimo na encimske (npr. katalaza, glutation peroksidaza, superoksidna dismutaza) in neencimske (npr. GSH, askorbinska kislina, α -tokoferol, karotenoidi) obrambne sisteme ter DNK popraviljalne encime (ligaze, endonukleaze). Antioksidanti so snovi, ki z radikali reagirajo, še preden bi ti lahko poškodovali celico. Delujejo lahko na več načinov: (a) z odstranjevanjem radikalov lahko preprečijo iniciacijo, (b) prekinejo verižno reakcijo, tako da odstranijo intermediarne radikale, (c) razgradijo reaktivne zvrsti v manj reaktivne produkte (20).

1.5.1 Glutation

Tripeptid glutation (GSH) je eden izmed najpomembnejših antioksidantov v človeškem telesu. Najvišja koncentracija glutatona se nahaja v jetrih (~5-10 mM). V celici je glutation prisoten večinoma v reducirani obliki (GSH > 98%), preostali delež obsega oksidirano obliko (GSSG), konjugate in kompleksirano obliko. Njegova sinteza poteka v vsaki celici višjih evkariontov. Sinteza poteka v citosolu (neribosomalno) v dveh korakih (Slika 5). V prvi reakciji iz glutamata in cisteina ob prisotnosti γ -glutamilcistein ligaze nastane dipeptid γ -glutamilcistein. V drugi reakciji glutation sintetaza doda glicin.



Slika 5: Sinteza glutationa in njegovih reakcij.

Razlaga okrajšav: **cys**, cistein; **glu**, glutamat; **gly**, glicin; **γ -GluCys**, γ -glutamilcistein; **GSSG**, oksidirana oblika glutationa; **X**, ksenobiotiki; **γ -GCL**, γ -glutamilcistein ligaza; **GPX**, glutation peroksidaza; **GSH-S**, glutation sintetaza; **GST**, glutation S-transferaza; **GR**, glutation reduktaza; **ox**, oksidanti.

Glutation sodeluje v mnogih bioloških procesih, kot so: prenos aminokislin preko membran; odstranjevanje elektrofilov, oksidantov, radikalov, kovin in ksenobiotikov; vzpostavitev normalnega oksidoredukcijskega ravnotežja v celici; vzdrževanje sulfhidrilnih (-SH) skupin v reducirani obliki; biosinteza levkotrienov; regeneracija drugih antioksidantov (vitamina C in E). Z vezavo elektrofilov prepreči njihovo vezavo na nukleofilne skupine nukleinskih kislin in proteinov in tako prepreči nastanek genetskih mutacij in strukturnih ter funkcijskih sprememb proteinov. Reakcije konjugacije lahko potečejo spontano (predvsem v jetrih, kjer je glutationa največ), vendar jih običajno katalizira družina glutation S-transferaz (22).

Glutation vsebuje šest potencialnih mest za vezavo z kovinami: sulfhidrilna skupina cisteina, amino skupina glutamata, karboksilni skupini glicina in glutamata in dve peptidni vezi. Najvišjo afiniteto za vezavo kovin ima sulfhidrilna skupina cisteina. Vezava z endogenimi kovinami (Cu, Se, Cr, Zn) v fizioloških pogojih poteka spontano (neencimsko). Z enovalentnimi kovinami tvori kompleks v razmerju 1:1 (kovina : sulfhidrilna skupina), medtem ko z dvovalentnimi lahko nastanejo še stabilnejši kompleksi 1:2 (kovina : sulfhidrilna skupina). Kljub termodinamski stabilnosti so nastali kompleksi kinetično manj stabilni, kar pomeni, da se kovine hitro izmenjajo med dostopnimi sulfhidrilnimi ligandi. Glutation sodeluje v metabolizmu kovin preko štirih mehanizmov: (a) sodeluje pri prenosu kovin med različnimi ligandi; (b) omogoča transport kovin preko celičnih membran; (c) je vir cisteina, ki ima osrednjo vlogo v homeostazi kovin; in (d) je kofaktor v redoks reakcijah (23).

1.5.2 Od glutaciona odvisen encimski antioksidantni obrambni sistem

Glavna encima, ki sodelujeta v glutationskem oksido-redoks sistemu, sta glutacion peroksidaza (GPX) in glutacion reduktaza (GSR). Encim glutacion S-transferaza (GST) sodeluje v reakcijah konjugacije ksenobiotikov. Njihove reakcije so prikazane na **Sliki 5**.

1.5.2.1 Glutacion reduktaza (GSR)

Encim glutacion reduktaza spada med homodimerne flavoproteine. Znani sta dve izoformi encima, mitohondrijska in citoplazemska. Glavna vloga GSR je vzdrževanje dovolj visoke celične koncentracije reducirane oblike glutaciona (24).

Reakcija redukcije oksidantov (kot je vodikov peroksid) poteka v prisotnosti glutacion peroksidaze (GPX): $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$.

Pretvorbo oksidirane oblike glutaciona nazaj v reducirano omogoča encim glutacion reduktaza (GSR): $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$.

V humanem genomu se gen za GSR nahaja v eni kopiji, na mestu p21.1 kromosoma 8 in vsebuje 13 eksonov z vmesnimi intronskimi sekvencami (25). Gen za GSR je velik 48,4 kbp in ima znanih okoli 66 polimorfizmov (26).

Za polimorfizme, ki so v neposredni bližini, je velika verjetnost, da se dedujejo skupaj oz. vezano, na osnovi česar lahko ustvarimo haplotipe. Polimorfizem, ki najbolje predstavlja haplotip, imenujemo »tag« (vodilni, informativni, reprezentativni) polimorfizem. Pri vrednotenju vpliva enonukleotidnih polimorfizmov (angl. *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) na fenotip, si s pomočjo »tag« polimorfizma zožimo nabor potencialnih kandidatnih polimorfizmov in z njim lahko napovemo preostale SNP-je sosednjih kromosomskih regij. V diplomski nalogi smo se odločili preučiti vpliv *GSRint3* (A>G) polimorfizma, za katerega je bilo ugotovljeno, da je eden izmed »vodilnih« polimorfizmov. V literaturi in podatkovnih bazah je proučevani polimorfizem poimenovan na več načinov: rs2978663, A19278G, IVS 4-287A>G. **Preglednica IV** prikazuje pogostnost polimorfizma *GSRint3* (A>G) glede na rasno pripadnost (27).

V raziskavi, kjer so proučevali vpliv polimorfizmov v desetih izbranih antioksidantnih encimih na dovzetnost za razvoj raka na dojki, ni bilo potrjene povezave med nobenim polimorfizmom v genu za GSR (med katerimi je tudi *GSRint3* (A>G) polimorfizem) (26).

Preglednica IV: Pogostnost polimorfizma *GSRint3* (A>G).

Populacija (št.preiskovancev)	Odstotek genotipa (%)			Odstotek alela (%)	
	AA	AG	GG	A	G
Evropejci (226)	44,2	39,8	15,9	64,2	35,8
Evropejci (118)	40,7	37,3	22,0	59,3	40,7
Evropejci (120)	41,7	38,3	20,0	60,8	39,2
Azijci (172)	19,8	52,3	27,9	45,9	54,1
Subsaharski Afričani (224)	0,9	35,7	63,4	18,8	81,2
Afro Američani (124)	9,7	41,9	48,4	30,6	69,4

1.5.2.2 Glutation S-transferaza

Skupino encimov glutacion S-transferaz, sestavlja do sedaj znanih 8 različnih razredov odkritih pri ljudeh: alfa (α), kapa (κ), mu (μ), omega (ω), pi (π), sigma (σ), theta (θ) in zeta (ζ). Odkrili so jih v citosolu, mitohondriju in mikrosomih. Prisotne so v večini tkiv, največ v jetrih, prebavilih, ledvicah, testisih, nadledvični žlezi in pljučih. So substratno specifični encimi. Substrati imajo tri skupne značilnosti: hidrofobnost, prisotnost elektrofilnega atoma in lahko tudi neencimsko reagirajo z glutationom.

Glutation S-transferaze pripomorejo k hitrejši konjugaciji tako, da s pomočjo tirozina ali serina v aktivnem mestu odcepijo proton in posledično nastane GS^- . Sodelujejo pri detoksifikaciji (fazi II biotransformacije) elektrofilnih snovi, karcinogenov, zdravil, toksinov iz okolja in produktov oksidacijskega stresa, tako da omogočijo konjugacijo med glutationom in omenjenimi snovmi. Poleg teh reakcij sodelujejo tudi pri razgradnji aromatskih aminokislin, sintezi steroidnih hormonov, sintezi in inaktivaciji eikozanoidov in modulaciji signalnih poti (22).

- **Glutation S-transferaza mu 1 (GSTM1)**

Pri človeku je do sedaj znanih pet encimov mu (μ) razreda, ki se med seboj razlikujejo v podenotah. Glutation S-transferaza mu 1 je homodimerni encim, sestavljen iz 218 aminokislin. Nahaja se v citoplazmi (28). Geni, ki kodirajo mu razred encimov, so organizirani v skupino genov na kromosomu 1 na mestu p13.3 (29). Do danes je bilo odkritih več polimorfni različic. *GSTM1**A in *GSTM1**B se razlikujeta v eni aminokislini na mestu 173 (*A vsebuje lizin, *B asparagin). Znani sta tudi *GSTM1* delecija (*0) in podvojitve (*1×2). V primeru, da je delecija homozigotna (*GSTM1**0/*GSTM1**0), v nadaljevanju delecijski polimorfizem *GSTM1**0), sta odsotna oba alela, kar pomeni popolno odsotnost aktivnosti encima v vseh tkivih. Povezuje se s povečanim tveganjem za nekatere vrste raka (glave, vratu in pljuč) in vnetne bolezni (astma), verjetno zaradi večje občutljivosti na kancerogene snovi in toksine (22).

- **Glutation S-transferaza theta 1 (GSTT1)**

V theta razred poleg GSTT1 spada tudi GSTT2, ki se v 55% ujemata v aminokislinskem zaporedju. Genski zapis se nahaja na kromosomu 22 na mestu q11.23 (30). Spada med homodimerne encime in je sestavljen iz 240 aminokislin. Nahaja se v citoplazmi. Najden je bil v eritrocitih, jetrih in pljučih (31). V literaturnih podatkih je največkrat omenjena homozigotna delecija (*GSTT1*0/GSTT1*0*, v nadaljevanju delecijski polimorfizem *GSTT1*0*), ki pomeni popolno odsotnost aktivnosti encima in jo podobno kot *GSTM1*0*, povezujejo s povečanim tveganjem za raka glave, pljuč in vratu ter astmo (22).

Preglednica V: Pogostnost *GSTM1*0* in *GSTT1*0* polimorfizmov (32).

Polimorfizem	Populacija (št.preiskovancev)	Odstotek oseb (%)
<i>GSTM1*0</i>	Kavkazijci (10514)	53,1 %
	Azijci (1511)	52,9 %
	Afričani (479)	26,7 %
<i>GSTT1*0</i>	Kavkazijci (5577)	19,7 %
	Azijci (575)	47,0 %
<i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	Kavkazijci (5532)	10,4 %
	Azijci (407)	24,6 %

1.6 Kandidatni geni udeleženi v metabolizmu toksičnih kovin

Preglednica VI: Kandidatni geni, ki naj bi sodelovali v metabolizmu toksičnih kovin (Cd, Pb in Hg).
Nekatere študije se nanašajo tudi na njihovo povezanost z izidom nosečnosti.

Kovina	Proučevani gen	Protein	Pomen	Ref.
Cd	<i>MT</i>	metalotionein	Cd inducira nastanek MT, kar pripomore k njegovi detoksifikaciji. Nosilci genotipov, ki zmanjšajo sintezo MT, naj bi bili bolj občutljivi na toksične učinke Cd.	33, 34
			MT ima protektivno vlogo v celicah placentе.	35, 36
	<i>HSD11B2</i>	placentna 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2	Cd zmanjša ekspresijo <i>HSD11B2</i> gena, kar naj bi vplivalo na rast ploda.	37
Pb	<i>ALAD</i>	encim δ -aminolevulonat dehidrataza	Najpogosteje je proučevana Lys/Asn zamenjava na mestu 59 (ALAD 1-1 Lys/Lys, ALAD 1-2 Lys/Asn, ALAD 2-2 Asn/Asn). ALAD 2 encim naj bi močnejše vezal Pb in imel protektivno vlogo.	38, 39, 40
	<i>VDR</i>	vitamin D receptor	Vpliv na absorpcijo Pb in posledično na akumulacijo v kosteh ter mineralno kostno gostoto.	38, 39, 41
	<i>HFE</i>	protein za hemokromatozo	Vpliv na absorpcijo Pb in koncentracijo Pb v krvi.	38, 39
Hg	<i>geni, ki so sestavni del GSH sistema</i>	glutation S-transferaza (GST)	Pri nosilcih delecijskih polimorfizmov <i>GST</i> je eliminacija Hg preko GSH odsotna ali poteka počasneje, zato naj bi bila akumulacija in občutljivost na Hg povečana.	38
			<i>GSTT1*0</i> in/ali <i>GSTM1*0</i> polimorfizma sta povezana z nižjo porodno težo.	42
		encim glutamil-cistein ligaza (GCL)	Polimorfizmi, ki zmanjšajo produkcijo GCL encima posledično zmanjšajo sintezo GSH ter konjugacijo z Hg, kar vodi do počasnejše eliminacije Hg.	38, 43

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti, morebitno povezanost delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* ter polimorfizma *GSRint3* (A>G) s celokupnimi koncentracijami kovin, izmerjenimi v krvi (mCd, mHg, mMeHg, mPb) in laseh (hHg, hMeHg) nosečnic ter popkovnični krvi (cCd, cHg, cMeHg, cPb).

Hipotezi:

1. Prisotnost polimorfizma *GSRint3* (A>G) je povezana s koncentracijami preiskovanih kovin (Cd, Hg, MeHg, Pb).
2. Prisotnost delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0*, posameznega ali obeh, zviša koncentracije kovin (Cd, Hg, MeHg, Pb), v metabolizmu katerih je vključen GSH, v primerjavi s preiskovankami brez prisotnih delecij.

V prvem delu bomo:

- z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili del introna 3 gena *GSR* in uspešnost reakcije preverili z agarozno gelsko elektroforezo.
- z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov ugotovili genotipe polimorfizma *GSRint3* (A>G), pri čemer bomo uporabili restrikcijski encim ApaLI in razcepljene odseke ločili z agarozno gelsko elektroforezo.

V drugem delu bomo:

- z večkratno sočasno verižno reakcijo s polimerazo pomnožili odseke genov *GSTM1* in *GSTT1* in uspešnost reakcije ter prisotnost delecije preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

S statistično analizo bomo poskušali ugotoviti, ali so omenjeni polimorfizmi povezani s koncentracijami kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Opis preiskovank

V raziskavo smo vključili 212 nosečnic iz Hrvaške, katerim so na kontrolnih pregledih odvzeli vzorce periferne venske krvi in las (Klinički bolniški center, Klinika za ginekologijo in porodništvo, Reka). Ob rojstvu otroka je bila odvzeta popkovnična kri. Odvzeta kri nosečnic in popkovnična kri sta bili shranjeni pri -20°C za nadaljnje analize. Vzorce las so bili shranjeni pri sobni temperaturi. Za vsako nosečnico so bili pridobljeni še naslednji podatki: starost, informacije o kajenju ter teža in višina (s pomočjo katerih smo izračunali indeks telesne mase - ITM).

Vse preiskovanke so podale soglasje za vključitev njihovih vzorcev v študijo. Le-ta je bila odobrena s strani etične komisije tako v Sloveniji kot na Hrvaškem.

3.2 Določitev koncentracije kovin

Meritve celokupnih koncentracij kovin so bile opravljene na Inštitutu Jožef Štefan.

Koncentracije Cd, Mn, Pb in Se v krvi nosečnic oz. mater (mCd, mMn, mPb, mSe) in v popkovnični krvi (cCd, cMn, cPb, cSe) so bile določene z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (angl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy* – ICP MS). Induktivno sklopljena plazma je pogosto uporabljan plazemski izvor v emisijski in masni spektrometriji, ki iz komponent vzorca tvori ione. Ti ioni so nato usmerjeni v masni spektrometer, ki analizira ione glede na razmerje m/z (masa/naboj). Meritve so bile izvedene z inštrumentom Octapole Reaction System (ORS) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (7500ce, Agilent).

Koncentracija Hg v laseh (hHg) in krvi mater (mHg) ter popkovnični krvi (cHg) je bila določena z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (angl. *Atomic Absorption Spectroscopy* - AAS). AAS temelji na merjenju količine svetlobe, ki se ustavi v vzorcu. Vzorec pred meritvijo uparimo in atomiziramo (največkrat s plamenom). Skozi plamen posvetimo s

svetlobo primerne valovne dolžine in izmerimo delež prepuščene svetlobe. Meritve so bile izvedene z inštrumentom Direct Mercury Analyzer (Milestone Srl, Italija).

Koncentracija MeHg v lasih (hMeHg) je bila določena s plinskim kromatografom z detektorjem za zajetje elektronov (angl. *Gas Chromatography-Electron Capture Detector - GC-ECD*, HP 5890, Hewlett Packard, ZDA), katerega odziv je osnovan na nastanku negativnega iona eluirane spojine zaradi obsevanja z beta delci.

Koncentracija MeHg v krvi mater (mMeHg) in popkovnični krvi (cMeHg) je bila določena z metodo ekstrakcije, etilacije, ločitve s plinsko kromatografijo ter detekcijo z atomsko fluorescenčno spektrometrijo hladnih par (angl. *Cold Vapor-Atomic Fluorescence Spectrometry - CV AFS*, Brooks Rand Labs (Model I), ZDA).

3.3 Izolacija DNK in preverjanje uspešnosti izolacije DNK

Genomska DNK je bila izolirana iz levkocitov periferne venske krvi nosečnic, z uporabo kompleta izdelovalca Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit). Vzorci z izolirano DNK so bili za nadaljnjo izvedbo PCR reakcije redčeni z ultra čisto vodo v razmerju 1:20 in shranjeni pri -20°C . S spektrofotometrom ND1000 (NanoDrop, ZDA) je bila z meritvijo absorbance pri 260 nm izmerjena koncentracija izoliranih DNK. Raztopina DNK s koncentracijo 50 $\mu\text{g/mL}$ ima absorbanco približno 1. Čistost DNK je bila ocenjena s koeficientom absorpcije pri 260 nm in 280 nm.

3.4 Ugotavljanje polimorfizma v intronu 3 gena za GSR

3.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.4.1.1 Princip

Metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) se uporablja za *in vitro* sintezo tarčnega odseka DNK. Za izvedbo potrebujemo pufer, Mg^{2+} ione, deoksiribonukleozidtrifosfate (dATP, dCTP, dGTP in dTTP), termostabilno DNK polimerazo (*Taq* polimeraza iz bakterije *Thermus aquaticus*), dva začetna oligonukleotida, ultra čisto vodo in vzorec DNK, ki služi kot matrica. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel sestavljajo tri stopnje, ki potekajo pri različnih temperaturah. Prva stopnja je denaturacija, s katero ločimo verigi matrične DNK. Sledi ohlajanje, kar omogoči prileganje ustreznih oligonukleotidnih začetnikov. V tretji stopnji poteče sinteza tarčnega odseka DNK, ki jo v smeri od 5' proti 3' katalizira *Taq* polimeraza. Encim je temperaturno obstojen in omogoča izvajanje reakcije pri višji temperaturi, kar vodi do hitre sinteze DNK. Običajno reakcija poteka v 30. do 40. ciklih, pri čemer koncentracija tarčne DNK eksponentno narašča. Po zadnjem ciklu sledi končno podaljševanje in inkubacija.

3.4.1.2 Reagenti

- pufer (GeneAmp 10X PCR Gold Buffer $MgCl_2$; 25 mm; 1,5 ml; Applied Biosystem, Roche, ZDA); sestava: 150 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,0 (pri sobni temperaturi)
- deoksiribonukleozidtrifosfati, 2 mM (10 μ L posamezne raztopine dATP, dCTP, dGTP, dTTP koncentracije 100 mM redčene z 460 μ L ultra čiste vode)
- raztopina $MgCl_2$ (25 mM; 1,5 ml; Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- istosmerni začetni oligonukleotidi GSR-F (5 μ L izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 μ L ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - TACCGGGTTCACGCCATTCT - 3'

- obratnosmerni začetni oligonukleotidi GSR-R (5 μ L izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 μ L ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - GTTAAAAGCCTCTGTGCCACTCAG - 3'
- DNK polimeraza (AmpliTaq Gold DNK Polymerase, 5 enot/ μ L, Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- ultra čista voda (pripravljena z aparatom Labwater Purelab Classic UF, Elga, Marlow, Velika Britanija)
- delovne raztopine DNK koncentracije 5-15 ng/ μ L pripravljene iz izolata

3.4.1.3 Aparature in oprema

- delovna komora za PCR z UV svetlobo (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner, Latvija)
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μ L; 2-20 μ L; 20-200 μ L; Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipete (10 in 200 μ L, Sarstadt, Nemčija)
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete
- epruvete s pokrovčkom (0,5 in 1,5 mL)
- ciklični pomnoževalnik (MWG AG Biotech Primus 96 plus, Nemčija)
- centrifuga (FVL-2400N Combi-Spin, Biosan, Latvija; Mikro-242, Tehnica, Železniki, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija)

3.4.1.4 Postopek

Pri pripravi reakcijske zmesi za pomnoževanje je potrebno preprečiti kontaminacijo s tujo DNK, sicer bi dobili nespecifične produkte. Delo je potekalo v posebnem prostoru, kamor smo vstopali v čisti halji in obutvi, namenjeni izključno uporabi v tem prostoru. Vedno smo uporabljali zaščitne rokavice (brez smukca) in jih po potrebi večkrat zamenjali. Delovne površine, pribor in PCR komoro smo očistili z 10% raztopino etanola in 3% raztopino natrijevega hipoklorita. Epruvete in nastavke za pipete smo predhodno avtoklavirali, jih pred prenosom v komoro prav tako očistili s 3% raztopino natrijevega hipoklorita in jih skupaj z ostalim priborom za 25 minut izpostavili UV-svetlobi. Medtem smo vse potrebne reagente in vzorce, ki so bili shranjeni pri -20°C odtalili. DNK

polimerazo smo iz zamrzovalnika vzeli tik pred uporabo in jo nato takoj vrnil nazaj, sicer bi lahko izgubila aktivnost.

Reakcijsko zmes (**Preglednica VII**) smo pripravili v 5- do 30- kratni količini, ki smo ji prišteli prebitek, zaradi izgub pri delu. V vsako epruveto smo odpipetirali 19 μL pripravljene zmesi in 1 μL vzorčne DNK ter premešali in centrifugirali. Pripravili smo tudi slepi vzorec (negativna kontrola, pokazatelj morebitne kontaminacije), ki smo mu namesto vzorčne DNK dodali 1 μL ultra čiste vode.

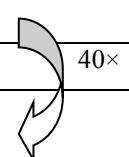
Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNK.

SESTAVINA	VOLUMEN (μL)
puffer	2
dNTP	2
raztopina MgCl_2	1,6
istosmerni začetni oligonukleotidi GSR-F	1
obratnosmerni začetni oligonukleotidi GSR-R	1
Taq polimeraza	0,15
ultra čista voda	11,25
vzorec DNK	1
končni volumen	20

Pripravljene epruvete smo dali v ciklični pomnoževalnik in zagnali predhodno optimiziran temperaturni program (44) z ustreznimi časovnimi intervali in številom ciklov (**Preglednica VIII**). Z reakcijo smo pomnožili 663 bp dolg odsek, z nadaljnjo RFLP analizo pa smo določili genotip.

Preglednica VIII: Pogoji PCR reakcije za pomnoževanje introna 3 v *GSR* genu.

STOPNJA	TEMPERATURA	ČAS
segrevanje	95°C	10 min
denaturacija	95°C	1 min
prileganje	62,5°C	30 s
podaljševanje	72°C	25 s
končno podaljševanje	72°C	8 min
ohlajanje	4°C	∞



3.4.2 Agarozna gelska elektroforeza

3.4.2.1 Princip

Ugotavljanje uspešnosti verižne reakcije s polimerazo smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 2% agaroznem gelu. Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki se uporablja za ločevnje nukleinskih kislin na osnovi velikosti. Gel deluje kot »sito«, skozi katerega se pod vplivom električnega polja prebijajo makromolekule. Zaradi negativnega naboja fosfatnih skupin v DNK, le-ta potuje od katode proti pozitivni elektrodi (anodi). Krajši odseki nukleinskih kislin potujejo najdlje, daljši pa zaradi večje molekulske mase in upora prepotujejo krajše razdalje. Za detekcijo se uporabljajo različna barvila, ki se interkalirajo med bazne pare dvoverižne DNK in pri tem pod UV svetlobo fluorescirajo intenzivneje kot proste molekule barvila.

3.4.2.2 Reagenti

- agaroz (Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- pufer 1xTAE (0,098 M Tris-HCl; 0,089 M borova kislina; 0,002 M EDTA)
- SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
- nanašalni pufer (0,35 % glicerola; 0,0023 % ksilencianola)
- označevalec velikosti DNK (velikost fragmentov: 50 bp, 150 bp, 300 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp; PCR Markers G316A, Promega Corp. ZDA)
- ultra čista voda (pripravljena z aparatom Labwater Purelab Classic UF, Elga, Marlow, Velika Britanija)

3.4.2.3 Aparature in oprema

- polavtomatska pipeta (2-20 µL, Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipete (10 µL, Sarstadt, Nemčija)
- kadička za elektroforezo (BIO-RAD Wide)
- vir napetosti (BIO-RAD Power Pac Basic, 300V/400 mA/75 W)
- G-komora za slikanje gelov povezana (G:BOX, Syngene, Cambridge, Velika Britanija) in računalnik s pripadajočo programsko opremo (GeneSnap in GeneTools)

- prijemalka za vročo steklovino
- tehtnica (Exacta 300 EB, Železniki, Slovenija)
- mikrovalovna pečica
- centrifuga Centric 150 (Železniki, Slovenija)
- parafilm
- nosilec za pripravo gela z glavnički
- urno steklo
- žlica
- merilni valj (100 ml)
- erlenmajerica (250 ml)

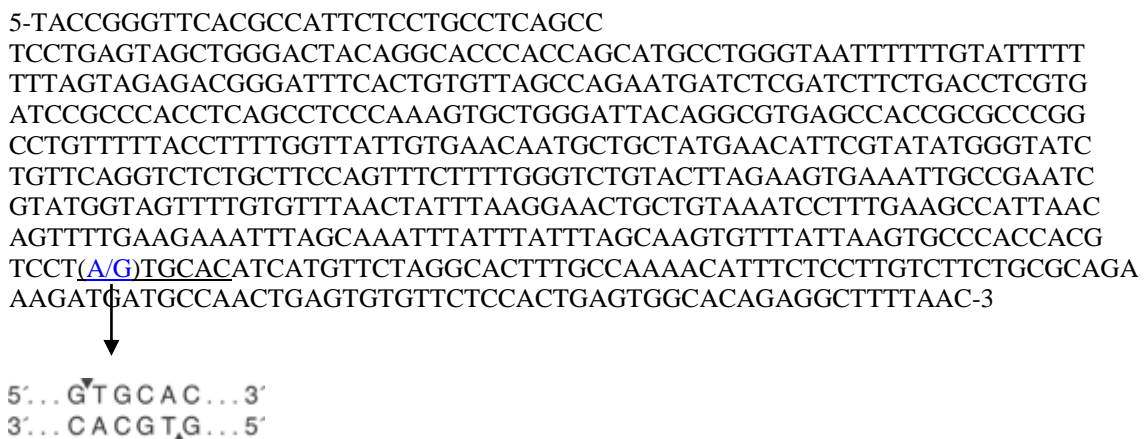
3.4.2.4 Postopek

Za pripravo 2% agaroznega gela na malem nosilcu smo natehtali 1,5g agaroze, dodali 75mL 1xTAE pufra, pokrili z urnim steklom in segrevali v mikrovalovni pečici, dokler ni nastala bistra raztopina. Izparelo tekočino smo nadomestili z dodatkom destilirane vode. Vročo raztopino smo pustili nekaj minut, da se je ohladila in ji nato dodali 5 μ L barvila SYBR Safe ter jo vlili v plastični nosilec. Gel smo zaščitili pred dnevno svetlobo in ga pustili 30 minut, da se je strdil. Strjen gel smo prenesli v elektroforezno kadičko z 1xTAE pufrom. Pred nanosom na gel, smo na parafilm odpipetirali 2 μ L produkta PCR in mu dodali 2 μ L nanašalnega pufra (s ksilencianolom in glicerolom). Ksilencianol obarva vzorce in tako omogoča vizualno spremljanje hitrosti potovanja DNK odsekov. Glicerol poveča gostoto in olajša usedanje vzorcev v žepke. Poleg PCR produktov smo po enakem postopku na gel nanесли tudi označevalec velikosti odsekov DNK in slepi vzorec. Elektroforeza je potekala 20 minut, pri stalni napetosti 90V. Po končani elektroforezi je sledilo slikanje gela pod UV svetlobo v G-komori. Za detekcijo smo uporabili barvilo SYBR Safe, ki ima podoben mehanizem vrinjanja kot etidijev bromid, vendar je v primerjavi z njim manj toksičen in mutagen.

3.4.3 Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in elektroforeza

3.4.3.1 Princip

Ugotavljanje genotipov polimorfizma *GSR*int3 (A>G) smo izvedli z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP). Metoda se uporablja za določanje znanih mutacij s pomočjo restrikcijskih encimov, ki prepoznajo določeno zaporedje in ga cepijo. Sprememba nukleotida lahko odstrani ali uvede cepitveno mesto. V našem primeru smo uporabili restrikcijski encim ApaLI, ki prepozna zaporedje prikazano na **Sliki 6**.



Slika 6: Odsek introna 3 gena *GSR*, ki ga pomnožujemo s pomočjo PCR reakcije. Modra barva označuje polimorfno mesto, ki ga prepozna restrikcijski encim ApaLI.

3.4.3.2 Reagenti

- NEB pufer 4 (20 mM tris-acetata, 50 mM kalijevega acetata, 10 mM magnezijevega acetata, 1 mM ditiotreitola, pH 7,9)
- goveji serumski albumin (BSA – angl. Bovine Serum Albumin, (10 mg/ml))
- restrikcijski encim ApaLI
- ultra čista voda
- produkti PCR gena za glutation reduktazo

3.4.3.3 Aparature in oprema

- vodna kopel
- centrifuga
- epruvete s pokrovčkom
- nastavki za pipete
- polavtomatske pipete

3.4.3.4 Postopek

Za inkubacijo vzorcev smo pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je prikazana v **Preglednici IX**. Encim smo iz zamrzovalnika vzeli tik pred uporabo in ga nato takoj vrnili nazaj. V vsako epruveto smo dali 9 μL reakcijske zmesi in 6 μL PCR produkta. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali in čez noč inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 37°C.

Preglednica IX: Sestava zmesi enega vzorca za analizo RFLP.

SESTAVINE	VOLUMEN (μL)
NEB pufer 4 (10 \times)	1,5
BSA (100 \times)	0,15
restrikcijski encim ApaLI	0,1
ultra čista voda	7,25
PCR produkt	6
končni volumen	15

Cepljene fragmente smo detektirali z agarozno gelsko elektroforezo na 3% agaroznem gelu. Postopek je opisan v poglavju 3.4.2.4, razlikuje se le količina sestavin za pripravo gela. Za pripravo 3% agaroznega gela smo uporabili 2,25g agaroze, 75mL 1xTAE puфра in 8 μL barvila SYBR Safe. Pripravili smo gel z večjimi žepki, kjer smo nanegli večji volumen (4 μL nanašalnega puфра in 4 μL vzorca). Elektroforeza je potekala 40 minut pri stalni napetosti 90V.

3.5 Ugotavljanje delecijских polimorfizmov *GSTMI*0* in *GSTTI*0*

3.5.1 Večkratna sočasna verižna reakcija s polimerazo in elektroforeza

3.5.1.1 Princip

Za razliko od klasične PCR reakcije, kjer pomožujemo le en izbrani odsek, gre pri večkratni PCR reakciji za pomnoževanje več tarčnih odsekov hkrati. V našem primeru smo sočasno pomnožili genske odseke *GSTMI*, *GSTTI* in *GPXI*. Zadnji je služil kot interna pozitivna kontrola. Če se genski odsek *GPXI* ni pomnožil, smo reakcijo ponovili. Posebno pozornost smo namenili izbiri ustreznih začetnih oligonukleotidov, ki morajo imeti podobne temperature tališča in se vezati na različno dolge tarčne odseke, zato da je možno glede na dolžino ločiti segmente vseh genskih odsekov z gelsko elektroforezo. Paziti smo morali tudi na to, da niso nastajali dimeri med začetnimi oligonukleotidi in da ni prišlo do nespecifičnega prileganja. Pri pripravi reakcijske zmesi je potrebno preprečiti kontaminacijo s tujo DNK, saj je ob uporabi več oligonukleotidnih začetnikov še večja verjetnost pojava nespecifičnih produktov.

```
GCTTCACGTGTTATGGAGGTTCCAGCCCACATATTCTTGGCCTTCTGCAGATCACTTTTGTAGAT
TTTCTCGTCTATGATGTCCTTGACCTCCACCGTATATTTGAGCCC
AAGTGCTTGGACGCCTTCCCAAATCTGAAGGACTTCATCTCCCG
```

Slika 7: Odsek gena *GSTMI*, ki ga pomnožujemo s pomočjo PCR reakcije.

```
ATGTGACCCTGCAGTTGCTCGAGGACAAGTTCCTCCAGAACAAGGCCTTCCTTACTGGTCCTCA
CATCT
```

Slika 8: Odsek gena *GSTTI*, ki ga pomnožujemo s pomočjo PCR reakcije.

3.5.1.2 Reagenti

- pufer (GeneAmp 10X PCR Gold Buffer MgCl₂; 25 mM; 1,5 ml; Applied Biosystem, Roche, ZDA); sestava: 150 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,0 (pri sobni temperaturi)
- deoksiribonukleozidtrifosfati, 2 mM (10 µL posamezne raztopine dATP, dCTP, dGTP, dTTP koncentracije 100 mM redčene z 460 µL ultra čiste vode)
- raztopina MgCl₂ (25 mM; 1,5 ml; Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- istosmerni začetni oligonukleotidi GSTM1-F (5 µL izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 µL ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - GCTTCACGTGTTATGGAGGTT - 3'
- obratnosmerni začetni oligonukleotidi GSTM1-R (5 µL izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 µL ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - CGGGAGATGAAGTCCTTCAGA - 3'
- istosmerni začetni nukleotidi GSTT1-F (5 µL izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 µL ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - ATGTGACCCTGCAGTTGC - 3'
- obratnosmerni začetni nukleotidi GSTT1-R (5 µL izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 µL ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - AGATGTGAGGACCAGTAAGG - 3'
- istosmerni začetni nukleotidi GPX1-F (5 µL izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 µL ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
5' - AGCCCAACTTCATGCTCTTC - 3'
- obratnosmerni začetni nukleotidi GPX1-R (5 µL izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95 µL ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)

5' - AGATGTGAGGACCAGTAAGG - 3'

- DNK polimeraza (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 5 enot/ μ L, Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- ultra čista voda (pripravljena z aparatom Labwater Purelab Classic UF, Elga, Marlow, Velika Britanija)
- delovne raztopine DNK koncentracije 5-15 ng/ μ L pripravljene iz izolata

3.5.1.3 Aparature in oprema

- delovna komora za PCR z UV svetlobo (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner, Latvija)
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μ L; 2-20 μ L; 20-200 μ L; Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipete (10 in 200 μ L, Sarstadt, Nemčija)
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete
- epruvete s pokrovčkom (0,5 in 1,5 mL)
- ciklični pomnoževalnik (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad)
- centrifuga (FVL-2400N Combi-Spin, Biosan, Latvija; Mikro-242, Tehnica, Železniki, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija)

3.5.1.4 Postopek

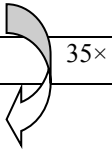
Postopek priprave reakcijske zmesi je opisan v poglavju 3.4.1.4. **Preglednici X in XI** prikazujeta količinsko sestavo posameznih sestavin, ki so potrebne za izvedbo večkratne PCR za pomnožitev odsekov *GSTMI* (dolžine 154 bp), *GSTTI* (dolžine 69 bp), *GPXI* (dolžine 400 bp) in pogoje v posameznih fazah PCR reakcije, pri čemer smo se ravnali po predhodno optimiziranem postopku (45).

Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNK.

SESTAVINA	VOLUMEN (μL)
pufer	2
dNTP	4
raztopina MgCl_2	2
razredčeni istosmerni začetni nukleotidi GSTM1-F	1,5
razredčeni obratnosmerni začetni nukleotidi GSTM1-R	1,5
razredčeni istosmerni začetni nukleotidi GSTT1-F	1,5
razredčeni obratnosmerni začetni nukleotidi GSTT1-R	1,5
razredčeni istosmerni začetni nukleotidi GPX1-F	1,5
razredčeni obratnosmerni začetni nukleotidi GPX1-R	1,5
Taq polimeraza	0,3
ultra čista voda	1,7
vzorec DNK	1
končni volumen	20

Preglednica XI: Pogoji večkratne verižne reakcije s polimerazo.

STOPNJA	TEMPERATURA	ČAS
segrevanje	95°C	10 min
denaturacija	95°C	1 min
prileganje	57,7°C	1 min
podaljševanje	72°C	1 min
končno podaljševanje	72°C	8 min
ohlajanje	8°C	∞



Tako kot pri prej opisani klasični izvedbi PCR reakcije, smo tudi pri večkratni sočasni PCR izvedli agarozno gelsko elektroforezo na 2% gelu z namenom, da ugotovimo prisotnost homozigotnih delecij. Postopek je opisan v poglavju 3.4.2.4. Elektroforeza je potekala 20 minut pri stalni napetosti 90V.

3.6 Statistične metode

Statistične analize smo izvedli s pomočjo programa PASW Statistics 18 (Release 18.0.0), proizvajalca SPSS Inc., ZDA. Glede na normalnost porazdelitve spremenljivk smo uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA in Post Hoc testi) ali neparametrične teste (Kruskal-Wallis).

- **Kolmogorov-Smirnov test** smo uporabili za preverjanje normalnosti porazdelitve spremenljivk. Vrednost $p \geq 0,05$ je pomenila normalno porazdelitev. V primeru, da spremenljivka ni bila normalno porazdeljena ($p < 0,05$), smo vrednosti logaritmirali in ponovno preverili normalnost porazdelitve.
- **One-way ANOVA (analiza varianc)** za preverjanje povezanosti polimorfizmov s spremenljivkami, ki se porazdeljujejo normalno ali logaritemsko normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično značilno razliko, vrednost $p > 0,05$ je pomenila, da razlike niso statistično značilne). Ker nas je zanimalo, katere genotipske podskupine se med seboj bistveno razlikujejo, smo opravili še dodatni **LSD Post Hoc test**.
- **ANCOVA (analiza kovarianc)** za preverjanje povezanosti polimorfizmov s spremenljivkami, ki se porazdeljujejo normalno ali logaritemsko normalno z upoštevanjem kovariate (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično značilno razliko, vrednost $p > 0,05$ je pomenila, da razlike niso statistično značilne).
- **Kruskal-Wallis test** za preverjanje povezanosti polimorfizmov s spremenljivkami, ki se ne porazdeljujejo normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično značilno razliko, vrednost $p > 0,05$ je pomenila, da razlike niso statistično značilne).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

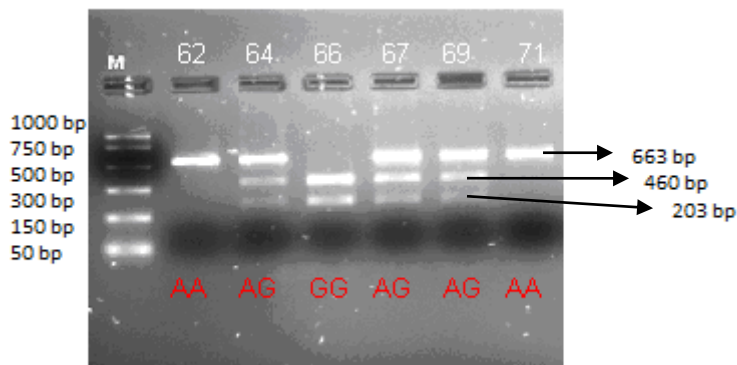
4.1 Značilnosti preiskovank

Preiskovanke so bile vključene v evropski projekt PHIME (angl. *Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata*), katerega namen je bil oceniti vpliv dolgotrajne izpostavljenosti nizkim količinam toksičnih kovin pri občutljivih skupinah populacije (nosečnice in otroci). **Preglednica XII** prikazuje lastnosti preiskovane skupine nosečnic (starost, ITM, kadilski status in koncentracije kovin). Pri kadilskih navadah smo nosečnice razdelili v 5 skupin: nekadilke, kadilke, bivše kadilke (ki so kadile 1-5 let), bivše kadilke (ki so kadile 6-10 let) in bivše kadilke (ki so kadile 11 let ali več). Po starosti smo jih razvrstili v skupine: < 30 let, 30-35 let, > 35 let ter pri ITM v skupine: < 18,5 kg/m² (podhranjenost), 18,5 - 24,9 kg/m² (normalno) in enako ali več kot 25 kg/m² (debelost).

V **Preglednici XIII** je podana pogostnost polimorfizmov preiskovanih genov. **Preglednica XIV** prikazuje rezultate genotipizacije, ki smo jim za statistično obdelavo podatkov dodelili vrednosti 0, 1, 2 in 3. Preglednice omenjene v tem poglavju (Rezultati in razprava) so prikazane v poglavju 7 (Priloge).

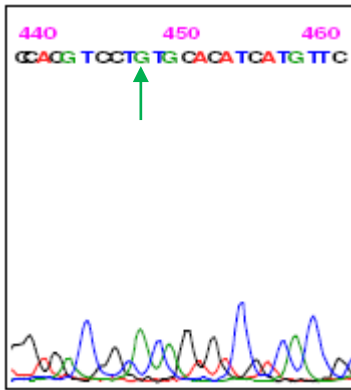
4.2 Ugotavljanje polimorfizma *GSRint3* (A>G)

Genotipe smo določili glede na dolžino cepljenih fragmentov na agaroznem gelu (**Slika 9**), s pomočjo PCR-RFLP metode. Če do cepitve ni prišlo, je bila vidna ena lisa dolžine 663 bp, kar je pomenilo genotip AA. Pri heterozigotih z genotipom AG, je prišlo do cepitve pri alelu G, medtem ko je alel A ostal nerazcepljen, zato so bile vidne tri lise dolžine 663 bp, 460 bp in 203 bp. Pri homozigotih z genotipom GG sta bili vidni dve lisi dolžine 460 bp in 203 bp.

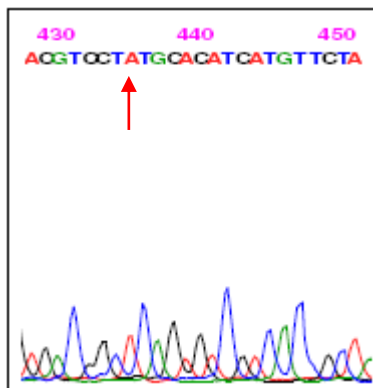


Slika 9: Prikaz cepljenih fragmentov na 3% agaroznem gelu po izvedbi RFLP z ApaLI encimom. M – marker (označevalec velikosti DNA), 10062, 10064, 10066, 10067, 10069, 10071 – oznake vzorcev.

Izmed 212 vzorcev preiskovank, pri dveh vzorcih (100185 in 100192), kljub večkratni ponovitvi ni bilo mogoče ugotoviti genotipa. PCR reakcija je bila uspešna, vendar po izvedeni RFLP analizi, zaradi nejasno vidnih lis, nismo mogli z gotovostjo potrditi, za kakšen genotip gre. Vzorca smo zato sekvenirali po principu kapilarne gelske elektroforeze in tako ugotovili genotip GG (vzorec 100185) in genotip AA (vzorec 100192). Del nukleotidnega zaporedja in polimorfno mesto prikazujeta **Slika 10** in **Slika 11**.



Slika 10: Del nukleotidnega zaporedja vzorca 100185 po kapilarni gelski elektroforezi. Zelena puščica označuje homozigotno prisotnost alela G.



Slika 11: Del nukleotidnega zaporedja vzorca 100192 po kapilarni gelski elektroforezi. Rdeča puščica označuje homozigotno prisotnost alela A.

Za statistično obdelavo podatkov smo dobljenim rezultatom dodelili naslednje vrednosti: 0 genotipu GG, 1 genotipu AG in vrednost 2 genotipu AA (**Preglednica XIV**). Za določitev normalnosti porazdelitve spremenljivk smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Vrednost $p \geq 0,05$ je pomenila normalno porazdelitev. V primeru, da spremenljivka ni bila normalno porazdeljena ($p < 0,05$), smo vrednosti logaritmirali in ponovno preverili normalnost porazdelitve. Če je tudi potem bila vrednost $p < 0,05$, smo privzeli, da se spremenljivka ne porazdeljuje normalno ter jo v nadaljevanju obravnavali z neparametričnim testom Kruskal-Wallis. Za spremenljivke, ki se porazdeljujejo normalno ali logaritemsko normalno, smo uporabili parametrične teste (ANOVA, ANCOVA, LSD Post Hoc test).

4.2.1 Osnovne značilnosti polimorfizma *GSRint3* (A>G) in njegova pogostnost pri nosečnicah iz Hrvaške

Genski polimorfizem pomeni prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena, ki se pojavljajo v vsaj 1% populacije (sicer gre za mutacijo). Enonukleotidni polimorfizem (angl. *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP), ki smo ga proučevali, se nahaja v intronu 3 gena za *GSR*. Intronska zaporedja predstavljajo nekodirajoči del gena, ki se nahajajo med eksoni in se tekom procesa prepisovanja izrežejo. Iz sestavljenih eksonov nato nastane protein. Polimorfizmi v intronih lahko delujejo kot regulatorni elementi, saj lahko predstavljajo vezavna mesta za transkripcijske dejavnike. Druga možnost je, da se lahko z zamenjavo nukleotida spremeni mesto za izrezovanje introna. Nekateri introni vsebujejo intronske ojačevalce in v primeru, da se polimorfizem nahaja v teh predelih, lahko vpliva na stopnjo izražanja proteina. Uvodoma opisani polimorfizem *GSRint3* (A>G) je eden izmed »tag« polimorfizmov in je informativni predstavnik ostalih SNP-jev izbrane regije. V diplomski nalogi smo želeli oceniti pomen te genske spremembe za napoved izpostavljenosti s težkimi kovinami inducirane oksidativnemu stresu.

Največ preiskovank je imelo genotip AG (N=102; 48,1%), sledi genotip AA (N=80; 37,7%) in genotip GG (N=30; 14,2%). Ugotovili smo, da se genotipi porazdeljujejo v skladu z Hardy-Weinbergovim načelom. Dobljena p vrednost presega izbrano stopnjo tveganja 0,05 (χ^2 -test, $p=0,999$). Po Hardy-Weinbergovem načelu se razmerje med genotipi ob določenih pogojih ohranja. Načelo velja, če so izpolnjeni naslednji pogoji: populacija je velika, izolirana (ni imigracij in emigracij), v njej ni mutacij, parjenje poteka naključno in naravna selekcija nima vpliva na nosilce posameznih alelov. Uporablja se kot teoretično osnovno stanje, s katerim vrednotimo odstopanja (46).

Rezultati testa χ^2 so pokazali, da je pogostnost polimorfizma *GSRint3* (A>G) pri preiskovankah iz Hrvaške primerljiva s podatki študij izvedenih na Evropejcih (**Preglednica IV** v uvodnem delu, N=226; $p=0,993$), pri katerih se je genotip AA izkazal za najpogostejšega, sledi genotip AG in najmanj zastopani genotip GG. Pripadniki drugih rasnih skupin, kot so Azijci, Afro Američani in subsaharski Afričani, imajo izrazito nižji odstotek genotipa AA. Pri Afro Američanih in subsaharskih Afričanih je najpogostejši genotip GG, medtem ko pri Azijcih prevladuje genotip AG.

4.2.2 Ocena povezanosti polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi

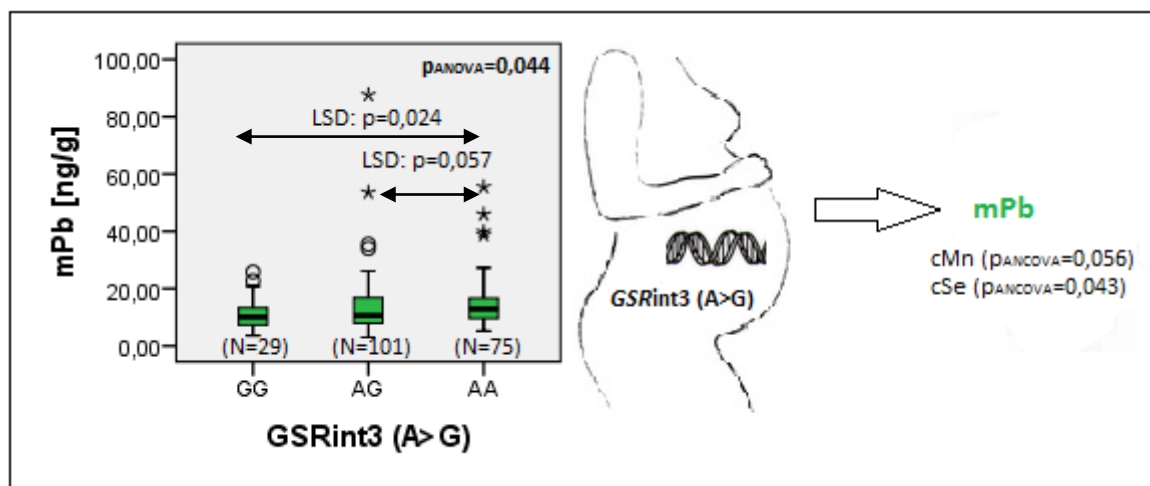
Encim GSR je poleg glutation peroksidaze pomemben za normalno ravnovesje reducirane in oksidirane oblike GSH, ki je eden izmed glavnih neencimskih antioksidantov. V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, ali je polimorfizem *GSRint3* (A>G) povezan s koncentracijami toksičnih kovin. Postavili smo ničelno hipotezo, da je proučevani polimorfizem povezan s koncentracijami kovin, ki so bile izmerjene v krvi (mCd, mHg, mMeHg in mPb) in laseh (hHg, hMeHg) nosečnic ter popkovnični krvi (cCd, cHg, cMeHg in cPb).

Za normalno in logaritemsko normalno porazdeljene spremenljivke smo izvedli parametrični test **ANOVA**, katerega rezultati so prikazani v **Preglednici XV**. S testom ANOVA smo analizirali značilnost razlik med povprečnimi vrednostmi genotipskih podskupin. Pri tem testu celotno variiranje vrednosti (merjeno s povprečnim kvadratnim odklonom vrednosti od aritmetične sredine - varianca) razdelimo na variiranje vrednosti zaradi razlik znotraj skupine in na variiranje vrednosti zaradi razlik med skupinami. Obe sestavini variance nato primerjamo med seboj. Vrednosti *p*, ki so manjše od 0,05, dokazujejo statistično značilne razlike in pomenijo, da obravnavana genska sprememba vpliva na koncentracijo kovin.

Da bi ugotovili, kateri pari genotipskih podskupin se med seboj statistično značilno razlikujejo, smo opravili **LSD Post Hoc test** (**Preglednica XVI**) in rezultate grafično prikazali na kvartilnih diagramih.

S testom **ANCOVA** smo skušali ugotoviti, ali obstaja statistično značilna razlika med polimorfizmom *GSRint3* (A>G) in kovinami, pri čemer smo želeli izključiti vpliv dejavnikov, ki bi lahko vplivali na njihove koncentracije. Mn in Se sta esencialna elementa, ki posredno sodelujeta v antioksidantnih procesih. Na akumulacijo kovin lahko vplivajo tudi starost, kajenje in ITM. Omenjene dejavnike smo zato izbrali za kovariate. Rezultati testa ANCOVA so prikazani v **Preglednici XVIII** in **Preglednici XIX**. Primere, pri katerih kovariatah se je pokazala (mejno) statistično značilna povezava med polimorfizmom *GSRint3* (A>G) in koncentracijami kovin smo tudi slikovno prikazali.

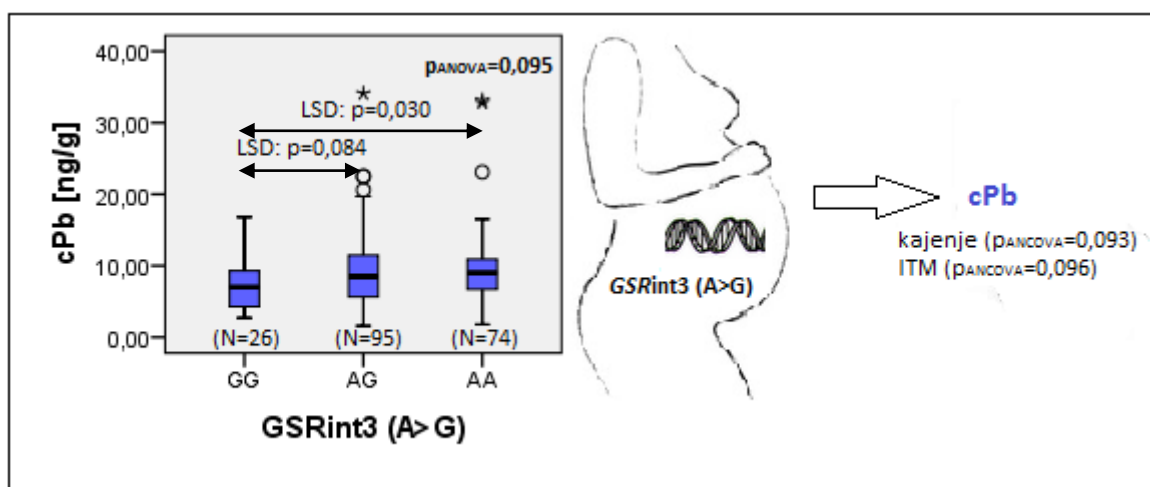
Rezultati testa ANOVA so pokazali statistično značilno razliko v koncentracijah mPb ($p_{ANOVA}=0,044$) in mejno statistično značilno razliko za koncentracijo cPb ($p_{ANOVA}=0,095$). V nadaljevanju smo za mPb z LSD Post Hoc testom ugotovili, da se statistično značilno razlikujejo preiskovanke z genotipoma GG in AA ($p=0,024$) ter AG in AA ($p=0,057$), kar je na **Grafu 1** prikazano z dvosmerno puščico. Statistično značilne razlike smo v nadaljevanju potrdili s testom ANCOVA (**Slika 12**), kar dodatno potrjuje povezanost polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijo mPb.



Graf 1: Povprečne vrednosti mPb in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za *GSRint3* (A>G) polimorfizem.

Slika 12: Vpliv polimorfizma *GSRint3* (A>G) na koncentracijo mPb ob upoštevanju kovariat cMn in cSe.

LSD Post Hoc test je pokazal, da se v koncentracijah cPb statistično značilno razlikujejo preiskovanke z genotipoma GG in AA ($p=0,030$) ter AG in GG ($p=0,084$) (**Graf 2**). V nadaljevanju smo s testom ANCOVA potrdili mejne statistično značilne razlike (**Slika 13**), kar dodatno potrjuje povezanost polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijo cPb.



Graf 2: Povprečne vrednosti cPb in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za *GSRint3* (A>G) polimorfizem.

Slika 13: Vpliv polimorfizma *GSRint3* (A>G) na koncentracijo cPb ob upoštevanju kovariat kajenje in ITM.

Za cCd, ki se ne porazdeljuje normalno, smo izvedli neparametrični Kruskal-Wallis test, ki ni pokazal statistično značilnih razlik med genotipskimi podskupinami (N=195; p=0,990).

Povezanosti polimorfizma *GSRint3* (A>G) z ostalimi preiskovanimi koncentracijami kovin v krvi (mCd, mHg, mMeHg) in laseh nosečnic (hHg, hMeHg) ter popkovnični krvi (cCd, cHg, cMeHg) nismo ugotovili.

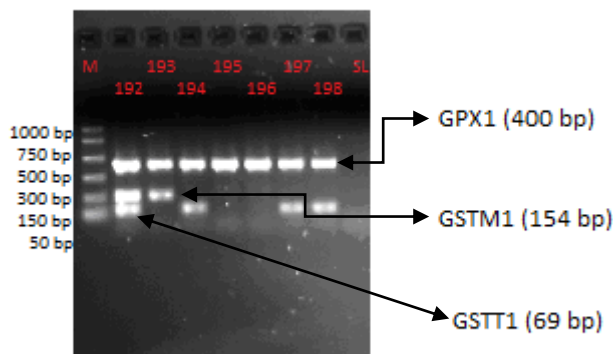
Rezultati prikazujejo, da je polimorfizem *GSRint3* (A>G) statistično značilno povezan s koncentracijo svinca v krvi nosečnic in popkovnični krvi. Nosilke genotipa GG izkazujejo večjo zaščito pred izpostavljenostjo svincu, saj imajo v povprečju najnižje krvne koncentracije svinca. Višje koncentracije dosegajo preiskovanke z genotipom AG in najvišje preiskovanke z genotipom AA (**Preglednica XVII**). Na podlagi rezultatov sklepamo, da imajo matere nosilke vsaj enega alela G ugodnejšo genetsko predispozicijo, saj izkazujejo večjo eliminacijo svinca, kar bi lahko bilo povezano z višjo aktivnostjo encima. Ugotovitve, da je genotip GG povezan z višjo aktivnostjo encima v trenutnih bazah podatkov nismo zasledili. Za utemeljitev domneve o »zaščitnem« vplivu alela G bi bilo potrebno raziskavo izvesti na večjem številu preiskovank in opraviti dodatne funkcionalne študije za ovrednotenje pomena polimorfizma *GSRint3* (A>G), saj njegova funkcija še ni jasna. Ker je *GSRint3* (A>G) »tag« polimorfizem (tj. informativni predstavnik ostalih SNP-jev izbrane regije), bi bilo smiselno raziskati sosednje polimorfizme, saj bi le-ti lahko dejansko vplivali na spremembe v aktivnosti encima, njegovemu izražanju ali na izrezovanje intronov.

Glede na trenutno dosegljive literaturne podatke, proučevani polimorfizem še nikjer ni bil preiskovan v povezavi s koncentracijami toksičnih kovin pri nosečnicah, zato naših rezultatov nismo mogli primerjati s podobno študijo. Vpliv svinca na encim GSR so na modelu podgane ugotavljali Baranowska-Bosiacka in sod. Po izpostavitvi živali svincu (v koncentraciji nižji od 10 µg/dL, ki je sicer postavljena kot varna meja za ljudi), so ugotovili nižjo ekspresijo in aktivnost GSR ter drugih antioksidantnih encimov in nižje koncentracije GSH. Do teh učinkov verjetno pride zaradi afinitete svinca do sulfhidrilnih skupin in kofaktorjev, kot sta cink in baker, ki ju svinec lahko nadomesti na njihovih vezavnih mestih metaloencimov (47).

Edina raziskava, ki je pokazala morebiten vpliv polimorfizma *GSRint3* (A>G) na razvoj patofizioloških procesov pri ljudeh, je bila študija kandidatnih genov, ki naj bi prispevali k nastanku osteoporoze. V njej je bila ugotovljena povezanost alela G z višjimi vrednostmi mineralne kostne gostote (MKG) v primerjavi s preiskovankami, ki so nosilke genotipa AA. To ponovno potrjuje »zaščitni« vpliv alela G, iz česar lahko domnevamo, da alel A prispeva k manjši antioksidantni zaščiti in posledično k večjemu oksidativnemu stresu ter tako posredno vpliva na znižanje MKG (44). Cebrian in sod. v študiji, ki je ugotavljala povezavo polimorfizma *GSRint3* (A>G) z rakom na dojki, niso ugotovili njegovega prispevka k nastanku raka na dojkah (26).

4.3 Ugotavljanje delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0*

Na agaroznem gelu smo iz prisotnosti oz. odsotnosti lis prepoznali genotip (Slika 14). Pri vseh vzorcih je bila vidna lisa velikosti 400 bp gena *GPXI*, s katero smo potrdili uspešno pomnožitev tarčnih odsekov in je služila kot pozitivna kontrola. Lisa dolžine 154 bp je potrdila homozigotno (*GSTM1/GSTM1*) in heterozigotno (*GSTM1/GSTM1*0*) prisotnost gena *GSTM1*, medtem ko je odsotnost lise pomenila homozigotno delecijo gena *GSTM1* (*GSTM1*0/GSTM1*0*). Najdlje je potovala lisa najkrajše dolžine (69 bp) in je pomenila homozigotno (*GSTT1/GSTT1*) in heterozigotno (*GSTT1/GSTT1*0*) prisotnost gena *GSTT1*, medtem ko je odsotnost lise pomenila homozigotno delecijo gena *GSTT1* (*GSTT1*0/GSTT1*0*). V primeru, da ni bilo vidne lise niti pri 154 bp niti pri 69 bp, smo potrdili homozigotno prisotnost obeh delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0*.



Slika 14: Prikaz produktov večkratne sočasne PCR reakcije na 2% agaroznem gelu. M – marker (označevalec velikosti DNA), 100192, 100193, 100194, 100195, 100196, 100197, 100198 in SL – oznake vzorcev in slepi vzorec.

Rezultate o genih *GSTM1* in *GSTT1* smo obravnavali posamično, kot tudi v kombinaciji (**Preglednica XIV**). To pomeni, da smo vsaki preiskovanki najprej določili prisotnost oz. odsotnost polimorfizma *GSTM1*0* ali *GSTT1*0*. Za statistično obdelavo smo rezultatom dodelili vrednosti 0 in 1. Vrednost 0 je pomenila odsotnost delecijekega polimorfizma *GSTM1*0* oz. *GSTT1*0* (lisa na elektroforeznem gelu je bila vidna, kar je pomenilo prisotnost odseka gena oz. normalno aktivnost encima) in vrednost 1 prisotnost delecijekega polimorfizma *GSTM1*0* oz. *GSTT1*0* (lisa na elektroforeznem gelu ni bila vidna, kar je pomenilo delecijo odseka gena oz. odsotnost encima). Vidnost lise na elektroforeznem gelu je pomenila tako heterozigotne kot tudi homozigotne nosilce alelov, saj med njimi nismo uspeli ločiti.

Nato smo dodali še spremenljivko »kombinacija«, s katero smo prikazali sočasno pojavnost obeh polimorfizmov, pri čemer smo rezultatom dodelili vrednosti 0, 1, 2 in 3. Vrednost 0 je pomenila odsotnost obeh delecijeških polimorfizmov, medtem ko je vrednost 3 pomenila njuno prisotnost. Vrednost 1 je pomenila prisotnost delecijekega polimorfizma *GSTM1*0* in odsotnost *GSTT1*0*. Vrednost 2 je bila dodeljena preiskovankam s prisotnim *GSTT1*0* deleciješkim polimorfizmom in odsotnim *GSTM1*0* deleciješkim polimorfizmom.

4.3.1 Pogostnost delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* pri nosečnicah iz Hrvaške

Pri 211 preiskovankah smo ugotovili naslednjo pogostnost (**Preglednica XIII**) delecijjskih polimorfizmov:

- homozigotna (*GSTM1/GSTM1*, *GSTT1/GSTT1*) in heterozigotna (*GSTM1/GSTM1*0*, *GSTT1/GSTT1*0*) prisotnost obeh genov:
77 (36,5%) preiskovank
- homozigotna delecija *GSTM1* gena (*GSTM1*0/GSTM1*0*):
83 (39,3%) preiskovank
- homozigotna delecija *GSTT1* gena (*GSTT1*0/GSTT1*0*): 21 (10,0%) preiskovank
- homozigotna delecija obeh genov (*GSTM1*0/GSTM1*0*, *GSTT1*0/GSTT1*0*):
30 (14,2%) preiskovank.

Pri eni preiskovanki (vzorec št. 100012) je vzorca DNK zmanjkalo in analize zato nismo opravili.

Pogostnost delecijjskih polimorfizmov hrvaških nosečnic smo primerjali z rezultati študij izvedenih na ostalih Kavkazijcih, Azijcih in Afričanih (**Preglednica V** v uvodnem delu). Rezultati testa 2×2 so pokazali, da pogostnost delecijjskega polimorfizma *GSTM1*0* ni primerljiva s podatki študij, izvedenih na Kavkazijcih (N=10514; p=0,049). Prav tako je isti test pokazal, da tudi pogostnost delecijjskega polimorfizma *GSTT1*0* ni primerljiva s podatki študij, izvedenih na Kavkazijcih (N=5577; p=0,000). Možen razlog za razlike v pogostnosti polimorfizmov je lahko majhno število preiskovank, ki ne obsega enakomerne porazdelitve polimorfizmov.

Pri delecijjskih polimorfizmih nismo testirali skladnosti s Hardy-Weinbergovim načelom, ker smo v našem primeru obravnavali le dve skupini (eno skupino so predstavljale nosilke z homozigotno delecijo in drugo homozigotne nosilke brez delecije ter heterozigotne nosilke). Hardy-Weinbergovo pravilo uporabimo, kadar obravnavamo 3 skupine (nemutirane homozigote, heterozigote, mutirane homozigote).

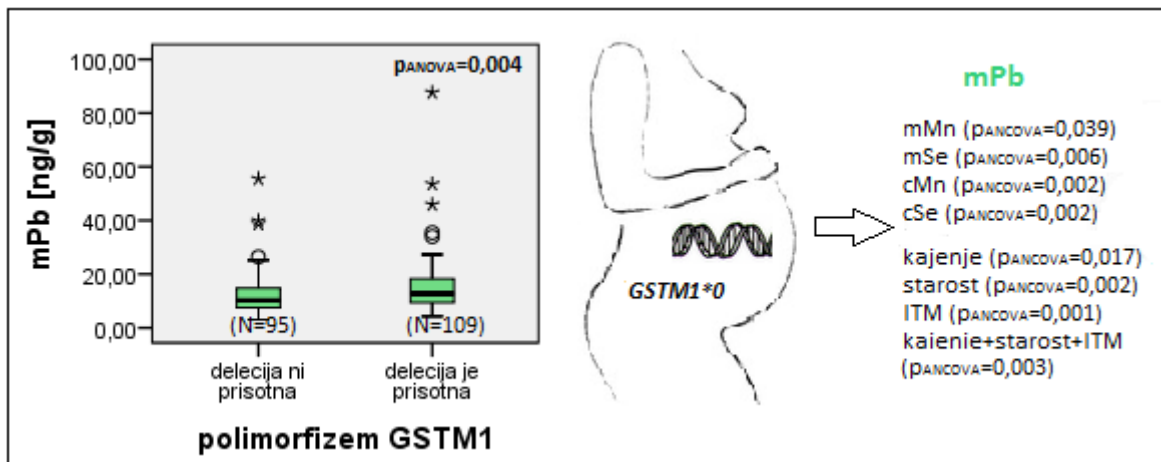
4.3.2 Ocena povezanosti delecijekega polimorfizma *GSTM1*0*, delecijekega polimorfizma *GSTT1*0* in kombinacije obeh delecijeških polimorfizmov s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi

Potrjeno je bilo, da je v prenatalnem, neonatalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju povečana občutljivost organizma za kovine in ostale ksenobiotike, ker organski sistemi še niso dokončno razviti. Občutljivost zarodka na toksične snovi je odvisna tudi od materine zmožnosti izločanja ksenobiotikov, pri čemer imajo pomembno vlogo genetski polimorfizmi antioksidantnih encimov, med katere sodita tudi *GSTM1* in *GSTT1*. V diplomski nalogi smo skušali ugotoviti, ali sta deleciješka polimorfizma omenjenih encimov povezana s koncentracijami Cd, Hg, MeHg in Pb, ki so bile izmerjene v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi. Postavili smo ničelno hipotezo, da prisotnost delecijeških polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0*, posameznega ali obeh, zviša koncentracijo kovin v primerjavi z preiskovankami brez prisotnih delecij. To smo tako kot pri polimorfizmu *GSRint3* (A>G) ugotavljali s pomočjo parametričnih (ANOVA, ANCOVA, LSD Post Hoc test) in neparametričnih statističnih testov (Kruskal-Wallis test), ki so opisani v poglavju 4.2.2.

Preglednica XX prikazuje rezultate testa ANOVA. Z nadaljnjim LSD Post Hoc testom (**Preglednica XXI**) smo obravnavali podatke spremenljivke za kombinacijo polimorfizmov, da bi ugotovili, katere genotipske podskupine se statistično značilno razlikujejo. Rezultate smo grafično prikazali na kvartilnih diagramih. Sledil je test ANCOVA (**Preglednice XXII – XXVII**), pri čemer smo slikovno prikazali primere, za katere kovariate se je pokazala (mejno) statistično značilna povezanost delecijekega polimorfizma *GSTM1*0*, delecijekega polimorfizma *GSTT1*0* in kombinacije obeh delecijeških polimorfizmov s koncentracijami toksičnih kovin.

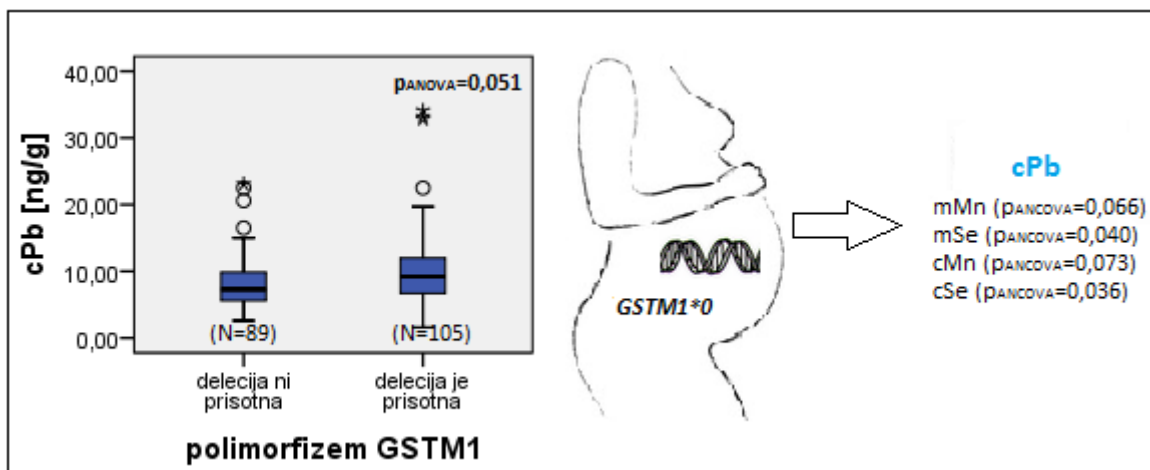
4.3.2.1 Ocena povezanosti delecijskega polimorfizma *GSTM1*0* s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi

Rezultati testa ANOVA (**Preglednica XX**) so pokazali statistično značilno razliko delecijskega polimorfizma *GSTM1*0* s koncentracijo mPb ($p_{ANOVA}=0,004$, **Graf 3**) ter mejno razliko za koncentracijo cPb ($p_{ANOVA}=0,051$, **Graf 4**). Omenjene statistično značilne razlike smo v nadaljevanju ob upoštevanju kovariat potrdili s testom ANCOVA (**Slika 15** in **Slika 16**), kar dodatno dokazuje povezanost delecijskega polimorfizma s koncentracijami mPb in cPb.



Graf 3: Povprečne vrednosti mPb za gen *GSTM1*.

Slika 15: Vpliv delecijskega polimorfizma *GSTM1*0* na koncentracijo mPb ob upoštevanju kovariat mMn, mSe, cMn, cSe, kajenja, starosti, ITM in kombinacije zadnjih treh.



Graf 4: Povprečne vrednosti cPb za gen *GSTM1*.

Slika 16: Vpliv delecijskega polimorfizma *GSTM1*0* na koncentracijo cPb ob upoštevanju kovariat mMn, mSe, cMn, cSe.

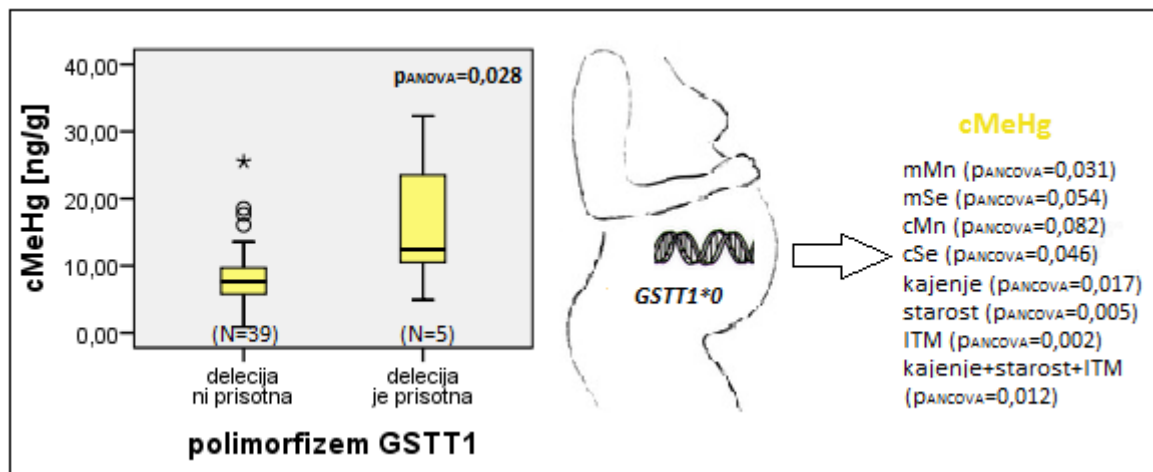
Povezanosti delecijekega polimorfizma *GSTM1*0* s koncentracijami mCd, mHg in mMeHg v krvi nosečnic ter s hHg in hMeHg v laseh nosečnic nismo dokazali. Prav tako nismo dokazali povezanosti s koncentracijami cCd, cHg in cMeHg v popkovnični krvi.

Prisotnost delecije gena *GSTM1* je potrdila našo hipotezo o višjih koncentracijah kovin. V primeru svinca se je to pokazalo tako v krvi matere kot tudi popkovnični krvi. Preiskovanke z delecijo gena *GSTM1* imajo v povprečju višje vrednosti svinca v primerjavi s preiskovankami, ki imajo prisoten *GSTM1* gen (**Preglednica XXVIII**). Kot smo uvodoma opisali, naj bi izločanje svinca preko žolča v feces potekalo v kompleksu z GSH. Ob odsotnosti encima *GSTM1* lahko predpostavimo počasnejšo eliminacijo in posledično višje krvne koncentracije svinca. Za nedvoumno utemeljitev te domneve bi bilo potrebno opraviti dodatne študije.

V mnogih študijah je bilo dokazano, da kovine povzročijo oksidativni stres, pri katerem se kot prilagoditveni mehanizem sproži povečana ekspresija genov za antioksidantne encime. Zanimiva je študija, v kateri so ugotovili, da se je po injiciranju svinčevega acetata povečala ekspresija GST encimov v ledvicah podgane, vendar ne kot posledica z svincem povzročene oksidativnega stresa, saj so malondialdehid (marker lipidne peroksidacije) in ostali kazalci oksidativnega stresa ostali nespremenjeni. V jetrih za razliko od ledvic, ni bila ugotovljena večja ekspresija GST. To nakazuje na kompleksnost mehanizmov in odziva različnih tkiv na izpostavljenost toksičnim kovinam (48).

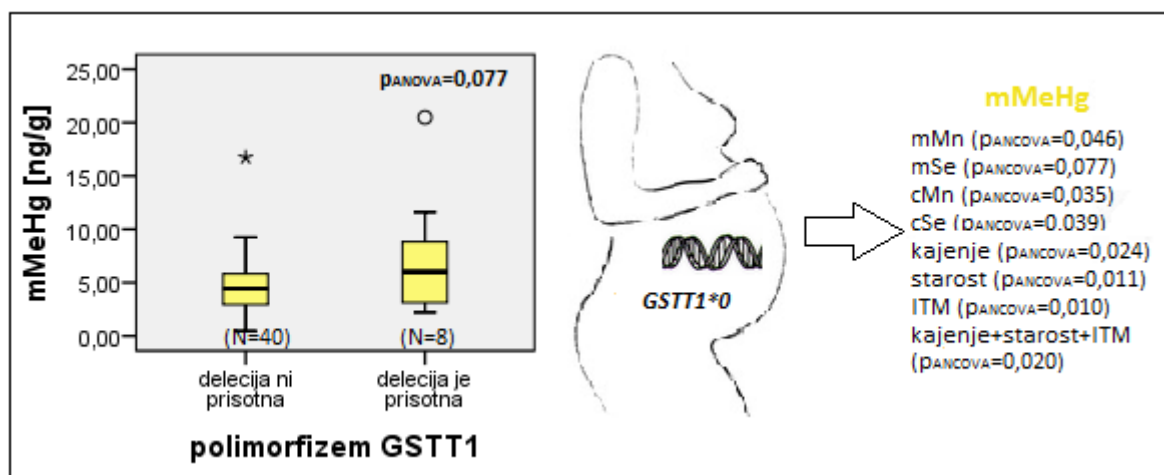
4.3.2.2 Ocena povezanosti delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi

Pri delecijemskem polimorfizmu *GSTT1*0* smo ugotovili (mejno) statistično značilno razliko s koncentracijo cMeHg ($p_{ANOVA}=0,028$, **Graf 5**), mMeHg ($p_{ANOVA}=0,077$, **Graf 6**) in hMeHg ($p_{ANOVA}=0,090$, **Graf 7**). Omenjene statistično značilne razlike smo v nadaljevanju ob upoštevanju kovariat potrdili s testom ANCOVA (**Slika 17**, **Slika 18** in **Slika 19**), kar dodatno dokazuje povezanost delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* s koncentracijami MeHg tako v krvi in laseh nosečnic kot tudi popkovnični krvi.



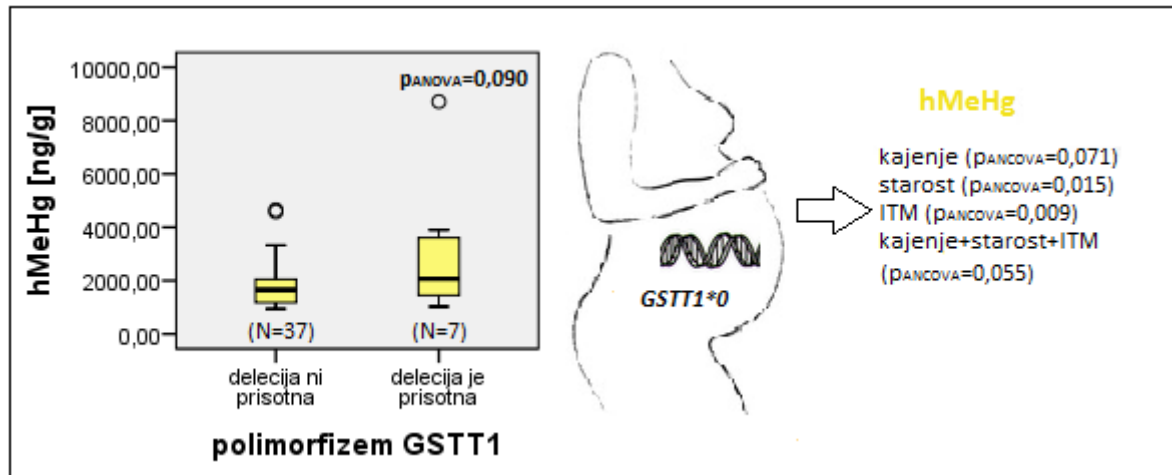
Graf 5: Povprečne vrednosti cMeHg za gen *GSTT1*.

Slika 17: Vpliv delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* na koncentracijo cMeHg ob upoštevanju kovariat mMn, mSe, cMn, cSe, kajenja, starosti, ITM in kombinacije zadnjih treh.



Graf 6: Povprečne vrednosti mMeHg za gen *GSTT1*.

Slika 18: Vpliv delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* na koncentracijo mMeHg ob upoštevanju kovariat mMn, mSe, cMn, cSe, kajenja, starosti, ITM in kombinacije zadnjih treh.



Graf 7: Povprečne vrednosti hMeHg za gen *GSTT1*.

Slika 19: Vpliv delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* na koncentracijo hMeHg ob upoštevanju kovariat kajenja, starosti, ITM in kombinacije vseh treh.

Povezanosti delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* s koncentracijami ostalih preiskovanih kovin v krvi (mCd, mHg in mPb) in laseh nosečnic (hHg) ter popkovnični krvi (cCd, cHg in cPb) nismo ugotovili.

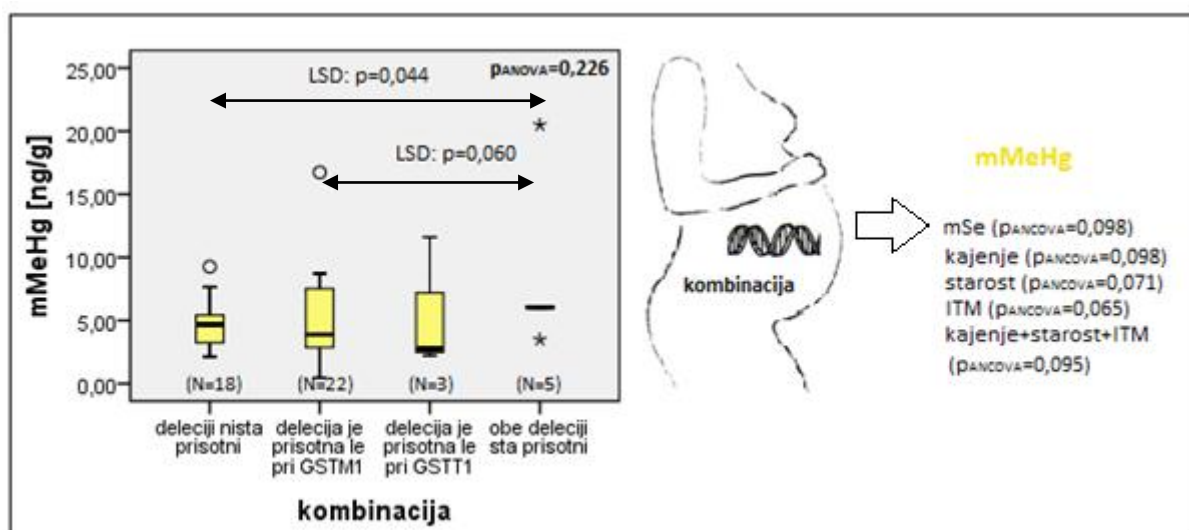
Preiskovanke s prisotno delecijo gena *GSTT1* imajo višje vrednosti metilživega srebra v primerjavi z preiskovankami, ki imajo prisoten *GSTT1* gen (**Preglednica XXIX**). To velja za koncentracije metilživega srebra v krvi in laseh preiskovank ter popkovnični krvi. Pri interpretaciji rezultatov, je potrebno upoštevati, da je število preiskovank majhno. Za zanesljivejše rezultate bi bilo potrebno povečati njihovo število in če bi ob tem ponovno potrdili naše ugotovitve, bi bilo smiselno preveriti tudi nevrološki status otrok teh mater in ga primerjati glede na delecijski polimorfizem *GSTT1*0*. Na osnovi tega, bi lahko pričakovali, da so otroci mater z delecijo gena *GSTT1* izpostavljeni večjemu tveganju za pojav nevroloških simptomov, če je nosečnica izpostavljena višjim koncentracijam metilživega srebra (npr. preko uživanja rib), ki je nevrotoksičen.

Pri *GSTM1*0* polimorfizmu smo ugotovili povezanost s koncentracijami svinca, medtem ko smo za *GSTT1*0* ugotovili povezanost s koncentracijami metilživega srebra. Za posamezne podtipе encimov družine GST je značilna substratna specifičnost za konjugacijo z GSH. Glede na rezultate lahko sklepamo, da encim GSTT1 izkazuje večjo substratno specifičnost za metilživo srebro, kar smo statistično značilno dokazali v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno natančneje raziskati, ali je domneva o substratni specifičnosti upravičena.

4.3.2.3 Ocena povezanosti kombinacije obeh delecijских polimorfizmov s koncentracijami toksičnih kovin v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi

Pri kombinaciji obeh delecijских polimorfizmov je bila značilna razlika pri koncentraciji mPb ($p_{ANOVA}=0,029$, **Graf 11**). Povezava s koncentracijami mMeHg ($p_{ANOVA}=0,226$, **Graf 8**), cMeHg ($p_{ANOVA}=0,117$, **Graf 9**) in hMeHg ($p_{ANOVA}=0,174$, **Graf 10**) je bila pri testu ANOVA manj statistično značilna, vendar smo z nadaljnjim LSD Post Hoc testom in ANCOVA analizo potrdili statistično značilno povezanost s koncentracijami MeHg v krvi in laseh nosečnic ter popkovnični krvi.

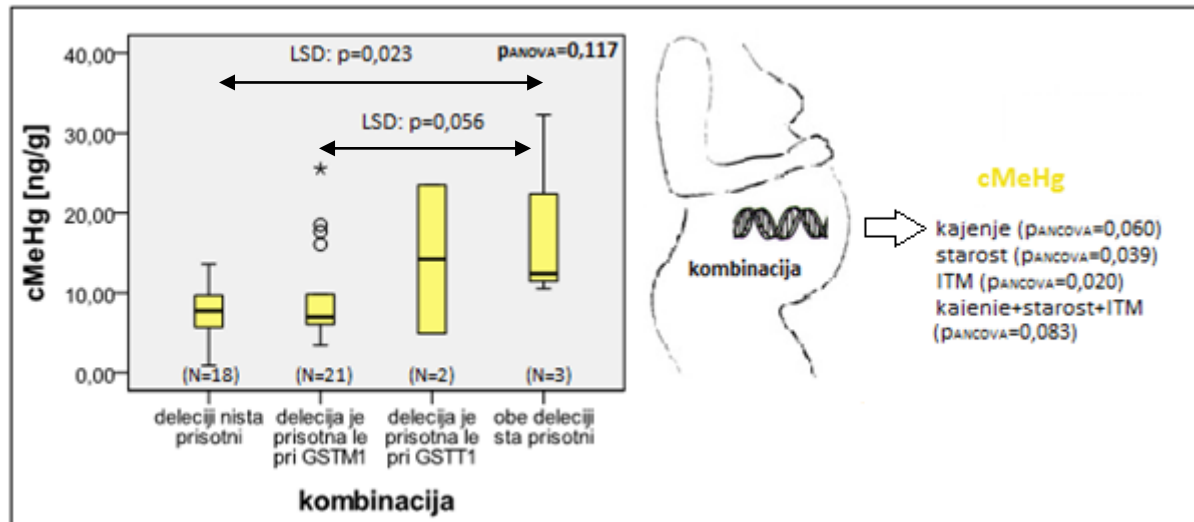
Pri mMeHg smo z LSD Post Hoc testom ugotovili (mejno) statistično značilne razlike med skupino preiskovank brez prisotnih delecij in skupino, ki ima obe deleciji prisotni ($p=0,044$) ter skupino, ki ima prisotno le delecijo gena *GSTM1* in skupino, ki ima prisotni obe deleciji ($p=0,060$). Povezanost kombinacije obeh delecijских polimorfizmov s koncentracijo mMeHg dodatno potrjujejo rezultati testa ANCOVA (**Slika 20**).



Graf 8: Povprečne vrednosti mMeHg in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov *GSTM1* in *GSTT1*.

Slika 20: Vpliv kombinacije obeh delecijских polimorfizmov na koncentracijo mMeHg ob upoštevanju kovariat mSe, kajenja, starosti, ITM in kombinacije zadnjih treh.

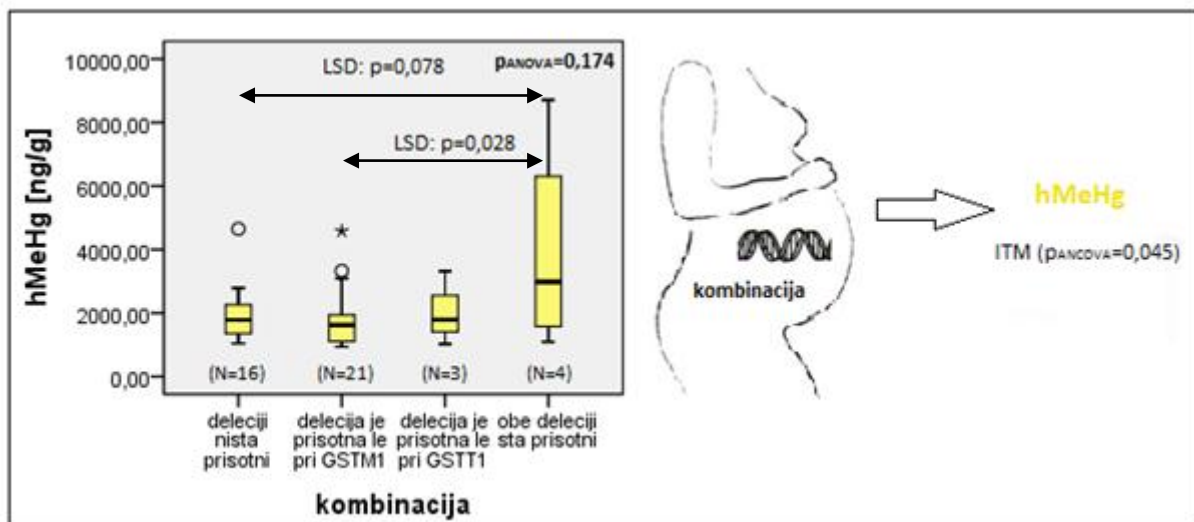
Pri cMeHg smo tako kot pri mMeHg ugotovili (mejno) statistično značilne razlike med skupino preiskovank brez prisotnih delecij in skupino, ki ima obe deleciji prisotni ($p=0,023$) ter skupino, ki ima prisotno le delecijo gena *GSTM1* in skupino, ki ima prisotni obe deleciji ($p=0,056$). Povezanost kombinacije obeh delecijских polimorfizmov s koncentracijo cMeHg dodatno potrjujejo rezultati testa ANCOVA (**Slika 21**).



Graf 9: Povprečne vrednosti cMeHg in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov *GSTM1* in *GSTT1*.

Slika 21: Vpliv kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov na koncentracijo cMeHg ob upoštevanju kovariat kajenje, starost, ITM in kombinacije vseh treh.

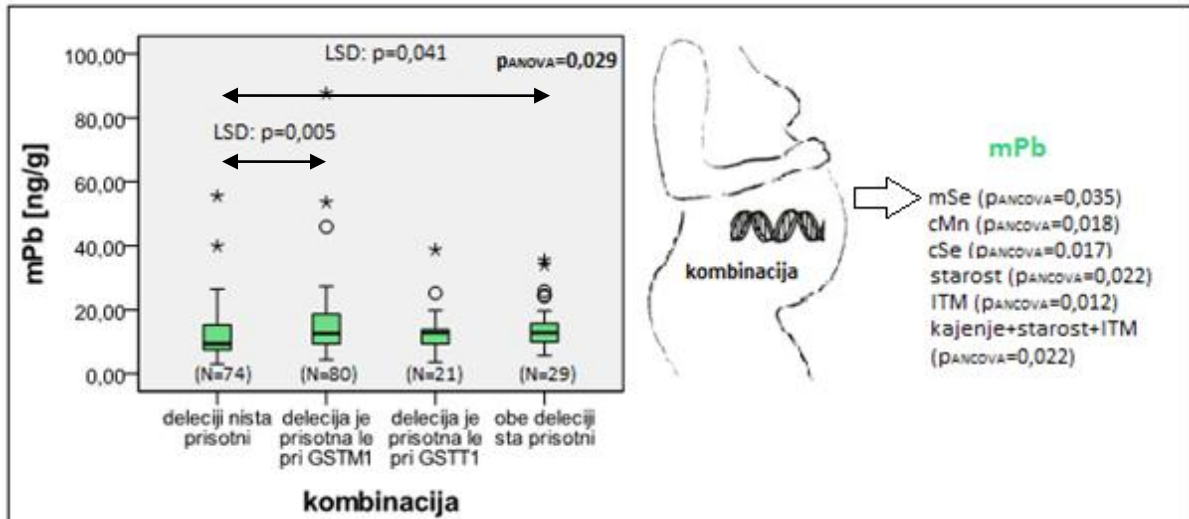
Pri hMeHg smo tako kot pri mMeHg in cMeHg ugotovili (mejno) statistično značilne razlike med skupino preiskovank brez prisotnih delecij in skupino, ki ima obe deleciji prisotni ($p=0,078$) ter skupino, ki ima prisotno le delecijo gena *GSTM1* in skupino, ki ima prisotni obe deleciji ($p=0,028$). Povezanost kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov s koncentracijo hMeHg dodatno potrjujejo rezultati testa ANCOVA (**Slika 22**).



Graf 10: Povprečne vrednosti hMeHg in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov *GSTM1* in *GSTT1*.

Slika 22: Vpliv kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov na koncentracijo hMeHg ob upoštevanju kovariate ITM.

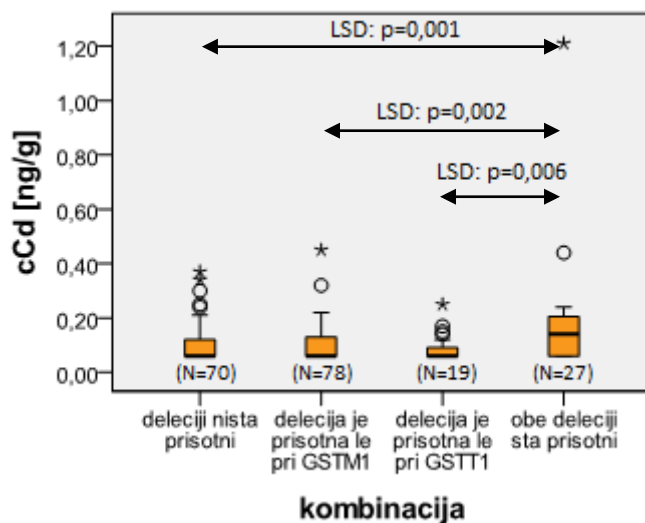
Pri mPb smo ugotovili statistično značilne razlike med skupino preiskovank brez prisotnih delecij in skupino, ki ima obe deleciji prisotni ($p=0,041$) ter skupino, ki ima prisotno le delecijo gena *GSTM1* in skupino, ki delecij nima prisotnih ($p=0,005$). Povezanost kombinacije obeh delecijских polimorfizmov s koncentracijo mPb potrjujejo tudi rezultati testa ANCOVA (Slika 23).



Graf 11: Povprečne vrednosti mPb in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov *GSTM1* in *GSTT1*.

Slika 23: Vpliv kombinacije obeh delecijских polimorfizmov na koncentracijo mPb ob upoštevanju kovariat mSe, cMn, cSe, starosti, ITM in kombinacije (kajenje+starost+ITM).

Za spremenljivko cCd smo ugotovili, da se ne porazdeljuje normalno in s Kruskal-Wallisovim neparametričnim testom pokazali statistično značilno povezanost kombinacije obeh delecijских polimorfizmov s koncentracije cCd ($p=0,032$), kar smo potrdili z nadaljnjim LSD Post Hoc testom (**Preglednica XXI** in **Graf 12**).



Graf 12: Povprečne vrednosti cCd in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov *GSTM1* in *GSTT1*.

Povezanosti kombinacije obeh delecijjskih polimorfizmov nismo ugotovili za koncentracije mCd in mHg v krvi nosečnic ter hHg v laseh nosečnic. Prav tako nismo dokazali povezanosti s koncentracijami cPb in cHg v popkovnični krvi.

Najvišje koncentracije metilživega srebra dosegajo preiskovanke z obema delecijama (**Preglednica XXX**). Izjema je koncentracija svinca v krvi preiskovank, pri kateri je najvišja povprečna vrednost opažena pri skupini preiskovank s prisotnim *GSTT1* genom in odsotnim *GSTMI* genom. To si lahko razlagamo z predpostavko opisano v raziskavi Fuciarelli s sod. (49), pri kateri naj bi odsotnost enega encima lahko aktivirala mehanizme, ki kompenzirajo njegovo pomanjkanje npr. aktivacija drugih genov družine GST encimov. Za potrditev te domneve bi bilo potrebno opraviti dodatne raziskave o medsebojnih vplivih encimov družine GST.

Rezultati se ujemajo z našo hipotezo. Ob deleciji genov, ki nosijo zapis za encima *GSTM1* in *GSTT1*, smo pričakovali višje vrednosti toksičnih kovin. To je povezano s počasnejšo eliminacijo, saj je konjugacija med GSH in kovinami, ki jo katalizirajo encimi družine GST počasnejša ali odsotna. Posledica tega je zmanjšana antioksidativna obramba, daljši čas zadrževanja kovin v telesu oz. akumulacija.

Literaturnih podatkov o povezanosti genov družine GST s koncentracijo kovin pri nosečnicah je malo. Največ raziskav je proučevalo povezanost delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* s koncentracijami živega srebra. V korejski študiji so ugotovili povezavo med prenatalno izpostavljenostjo živemu srebru in nižjo porodno težo otroka glede na prisotnost oz. odsotnost delecijjskega polimorfizma *GSTM1*0* in/ali *GSTT1*0*. Natančen mehanizem te povezave ni razjasnjen, domnevno naj bi k nižji porodni teži posredno prispeval oksidativni stres, ki ga izzove izpostavljenost višjim koncentracijam živega srebra ob odsotnosti GST encimov (42). Gundacker in sod. so ugotovili, da imajo posamezniki z obema odsotnima genoma *GSTM1* in *GSTT1* višje koncentracije živega srebra v laseh, v primerjavi z nosilci obeh genov (50). V slednji raziskavi so ugotovili tudi, da je pri nosilcih obeh genov *GSTM1* in *GSTT1* večje izražanje genov za metalotioneine, ki s svojimi cisteinskimi ostanki lahko vežejo kovine in tako omejijo njihovo razpoložljivost v telesu. To povezavo lahko razložimo z naslednjim modelom, ki so ga predpostavili Bhattacharya in sod.: encimi GST stimulirajo vezavo živega srebra z GSH, nastali

kompleks (živo srebro-GSH) je dovolj majhen, da vstopi v jedro. Tu kompleks razpade in sproščeno živo srebro inducira sintezo metalotioneinov (51).

Nasprotne ugotovitve so opisali Custodio in sod., ki v svoji raziskavi niso potrdili vpliva delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* na koncentracije (metil)živega srebra, vendar niso upoštevali vpliva kombinacije obeh sočasno prisotnih delecij genov (52, 53).

Med encimi družine GST v placenti prevladuje izoencim GSTP1, zato bi bilo zanimivo proučiti tudi polimorfizem *GSTP1* gena (54).

Študij, ki bi raziskovale povezanost obeh delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* s koncentracijami svinca in kadmija v trenutno dostopni literaturi nismo našli. V metabolizmu svinca so najboljše proučeni geni *ALAD* (encim δ -aminolevulonat dehidrataza), *VDR* (vitamin D receptor) in *HFE* (protein za hemokromatozo), medtem ko so za kadmij največkrat proučevani geni za metalotioneine.

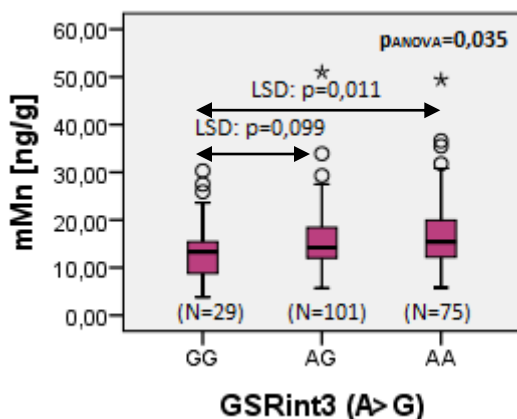
Naše preiskovanke so bile iz Hrvaške, ki je obmorska država, za katero lahko sklepamo večje uživanje rib, ki so za splošno populacijo glavni vir (metil)živega srebra (če izključimo poklicno izpostavljenost). Poleg tega je na območju obale Kaštela do leta 1990 delovala kloralkalna industrija, ki naj bi v 41. letih delovanja v okolje izpustila 22 do 56 ton živega srebra (55). Pomembno je poudariti, da je za ženske v rodni dobi, nosečnice in ženske, ki dojijo ter otroke, zaradi morebitne kontaminacije z nevrotoksičnim (metil)živim srebrom, priporočeno omejeno uživanje morskih sadežev in rib.

4.4 Ocena povezanosti polimorfizma *GSRint3* (A>G), delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* ter njihovih kombinacij s koncentracijami mangana in selen v krvi nosečnic ter popkovnični krvi

Mangan in selen posredno sodelujeta v antioksidantnih procesih. Selen je sestavni del selenoproteinov, med katerimi so tudi antioksidantni encimi (npr. glutathion peroksidaza, tioredoksin reduktaza). Mangan sestavlja številne metaloencime (piruvat karboksilaza, glutamin sintetaza, Mn-superoksid dismutaza, arginaza) in sodeluje kot kofaktor v mnogih encimskih reakcijah. Ob njunem pomanjkanju lahko pride do zmanjšane obrambe pred oksidativnim stresom. V naših predhodnih raziskavah smo ugotovili, da so obravnavane genske spremembe v genih za *GSR*, *GSTM1* in *GSTT1* povezane s koncentracijami toksičnih kovin, zato smo se odločili preveriti ali to velja tudi za esencialna elementa selen in mangan.

4.4.1 Ocena povezanosti polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijami mangana in selen v krvi nosečnic ter popkovnični krvi

S testom ANOVA smo ugotovili statistično značilno razliko v koncentracijah mMn ($p_{ANOVA}=0,035$, **Graf 13**), in sicer med preiskovankami z genotipoma GG in AA ($p=0,011$) ter mejno razliko med preiskovankami z genotipoma GG in AG ($p=0,099$). Pri testu ANCOVA nismo ugotovili statistično značilnih razlik.



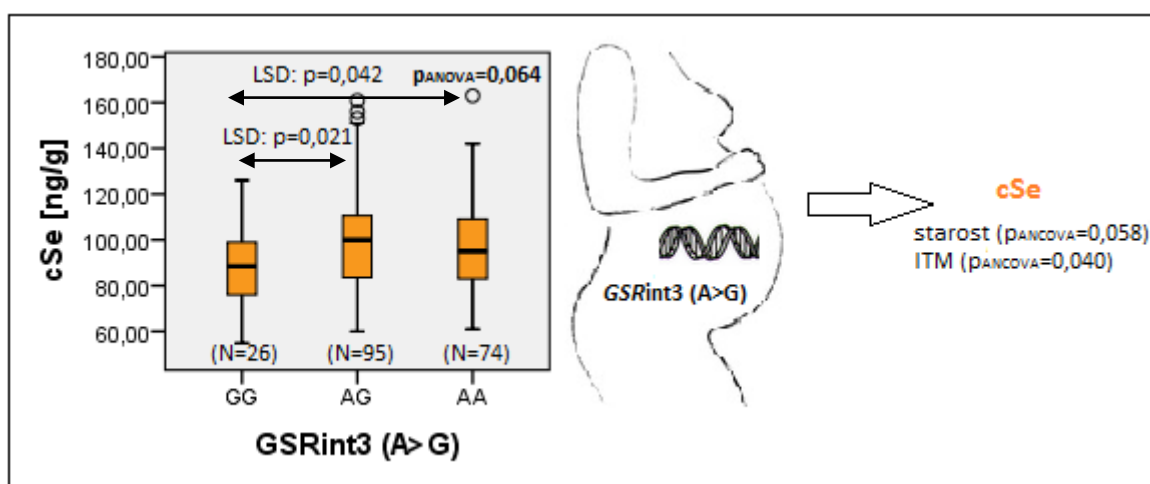
Graf 13: Povprečne vrednosti mMn in p-vrednost LSD Post Hoc testa za *GSRint3* (A>G) polimorfizem.

Tako kot smo predhodno ugotovili za koncentracije svinca v krvi nosečnic, smo tudi za mangan ugotovili, da najnižje koncentracije dosegajo nosilke z genotipom GG, sledijo

nosilke genotipa AG in AA. Slednje dosegajo najvišje povprečne krvne koncentracije mangana (**Preglednica XVII**).

Podobnih raziskav, kjer bi ugotavljali povezanost encima GSR s koncentracijami mangana ni na voljo. Znano je, da lahko pomanjkanje kofaktorjev (mednje sodi tudi mangan, saj je sestavni del aktivnega mesta SOD2) povzroči nižjo aktivnost tistih antioksidantnih encimov, ki za normalno delovanje potrebujejo kovinske ione. V študiji so ugotovili, da svinec lahko zniža koncentracije mangana preko inhibicije njegove intestinalne absorpcije. Po enakem mehanizmu lahko zniža tudi koncentracije selena, ki je sestavni del GPX ter tako posredno privede do nižje aktivnosti GPX (47).

V popkovnični krvi so rezultati testa ANOVA pokazali mejno statistično značilno razliko za koncentracijo cSe ($p_{ANOVA}=0,064$, **Graf 14**). Z LSD Post Hoc testom smo ugotovili, da se statistično značilno razlikujejo preiskovanke v skupini nosečnic z genotipoma GG in AA ($p=0,042$) ter AG in GG ($p=0,021$). Statistično značilno razliko smo v nadaljevanju potrdili s testom ANCOVA (**Slika 24**), kar dodatno potrjuje povezanost polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijo cSe.



Graf 14: Povprečne vrednosti cSe in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za *GSRint3* (A>G) polimorfizem.

Slika 24: Vpliv polimorfizma *GSRint3* (A>G) na koncentracijo cSe, ob upoštevanju kovariat starost in ITM.

Povezanosti polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijami mSe v krvi nosečnic in cMn v popkovnični krvi nismo dokazali.

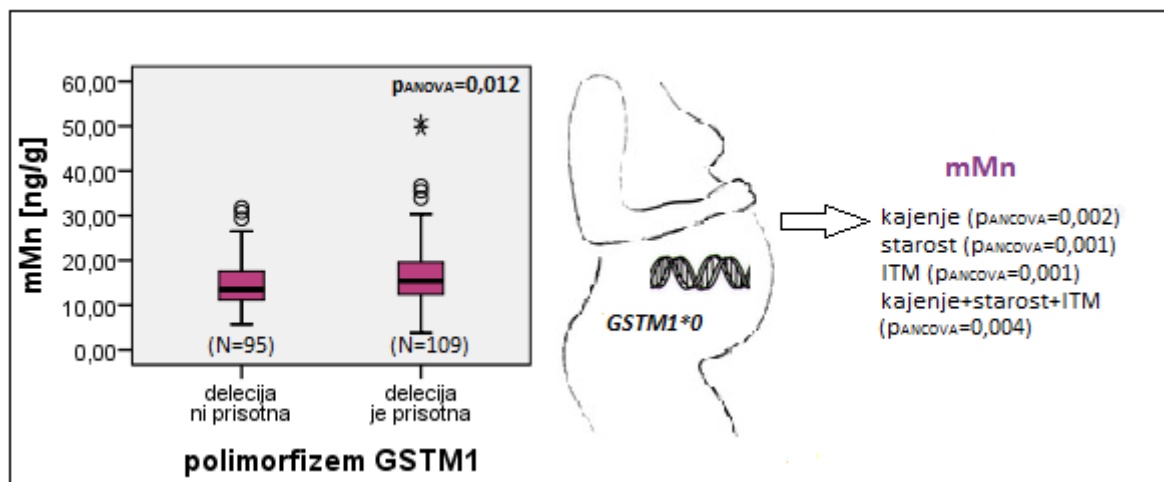
Rezultati prikazujejo, da je polimorfizem *GSRint3* (A>G) statistično značilno povezan tako s koncentracijami toksičnega mPb ter cPb in kot tudi z esencialna elementa mMn in cSe.

Koncentracije omenjenih elementov so bile pri nosilkah genotipa GG nižje v primerjavi z homozigotnimi (AA) preiskovankami.

Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da matere nosilke alela G izkazujejo večjo eliminacijo elementov. Rezultati nakazujejo »zaščitni« vpliv alela G v primeru, ko govorimo o vplivu na koncentracijo toksičnih kovin, vendar o »zaščitnem« pomenu ne moremo trditi v primeru esencialnih kovin, saj so tudi njihove koncentracije nižje v primeru alela G. Za razjasnitev domneve o »zaščitnem« vplivu alela G bi bilo potrebno raziskavo izvesti na večjem številu preiskovank in opraviti dodatne študije za ovrednotenje polimorfizma *GSRint3* (A>G), saj njegov pomen še ni jasen.

4.4.2 Ocena povezanosti delecijejskega polimorfizma *GSTM1*0*, delecijejskega polimorfizma *GSTT1*0* in kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov s koncentracijami mangana in selen v krvi nosečnic ter popkovnični krvi

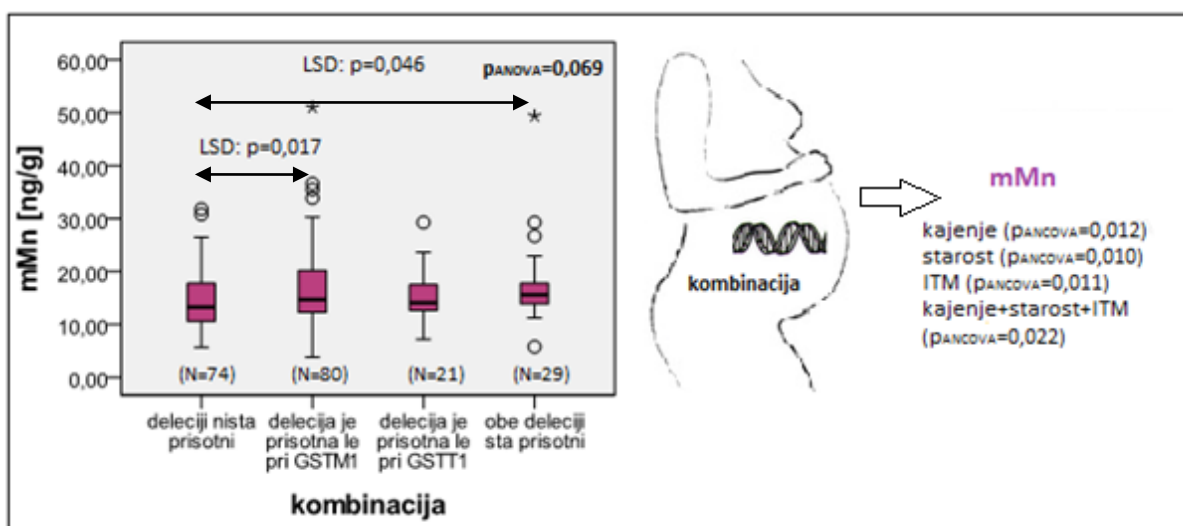
Rezultati testa ANOVA so pokazali (mejno) statistično značilno razliko delecijejskega polimorfizma *GSTM1*0* ($p_{ANOVA}=0,012$, **Graf 15**) in kombinacije obeh delecijejskih polimorfizmov ($p_{ANOVA}=0,069$, **Graf 16**) s koncentracijo mMn. To smo v nadaljevanju ob upoštevanju kovariat dodatno potrdili s testom ANCOVA (**Slika 25** in **Slika 26**).



Graf 15: Povprečne vrednosti mMn za gen *GSTM1*.

Slika 25: Vpliv delecijejskega polimorfizma *GSTM1*0* na koncentracijo mMn ob upoštevanju kovariat kajenje, starost, ITM in kombinacije vseh treh.

Ob upoštevanju obeh delecijejskih polimorfizmov smo z LSD Post Hoc testom ugotovili statistično značilne razlike med skupino preiskovank brez prisotnih delecij in skupino, ki ima obe deleciji prisotni ($p=0,046$) ter skupino, ki ima prisotno le delecijo gena *GSTM1* in skupino, ki delecij nima prisotnih ($p=0,017$).



Graf 16: Povprečne vrednosti mMn in p-vrednosti LSD Post Hoc testa za kombinacijo genov *GSTM1* in *GSTT1*.

Slika 26: Vpliv kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov na koncentracijo mMn ob upoštevanju kovariat kajenje, starost, ITM in kombinacije vseh treh.

Povezanosti delecijskega polimorfizma *GSTM1*0* in kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov nismo dokazali za koncentracije mSe, cSe in cMn. Za delecijski polimorfizem *GSTT1*0* nismo ugotovili povezanosti s koncentracijami mangana niti selena v krvi nosečnic ter popkovnični krvi.

Ob upoštevanju kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov najvišje povprečne koncentracije mangana v krvi dosegajo preiskovanke z obema delecijama in najnižje preiskovanke z obema prisotnima encimoma *GSTM1* in *GSTT1* (**Preglednica XXX**). Preiskovanke brez gena *GSTM1* imajo v povprečju višje vrednosti mangana v primerjavi s preiskovankami, ki imajo prisoten *GSTM1* gen (**Preglednica XXVIII**).

Študija Vinayagamoorthy in sod. je prav tako pokazala povišane koncentracije mangana pri preiskovancih s prisotnim *GSTM1* genom, vendar vrednosti niso bile statistično značilno različne. Verjetno je razlog v številu vzorcev, ki je v našem primeru višje, poleg tega vzorcev nismo razdelili na kontrolno in poklicno izpostavljeno skupino. Članek je obravnavan na azijski populaciji, kar ponovno privede k variabilnosti rezultatov raziskav. Znižana konjugacija GSH z manganom, bi lahko bila povezana z manganizmom (56).

V naših raziskavah smo ugotovili, da so obravnavane genske spremembe v genih za *GSR*, *GSTM1* in *GSTT1* povezane s koncentracijami toksičnih kovin in esencialnih elementov kot sta selen in mangan.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo na večjem številu preiskovank smiselno natančneje proučiti večje število genskih polimorfizmov, prisotnih v genih, ki sodelujejo pri metabolizmu kovin, saj trenutno še ni na voljo ustreznega zdravljenja za kronično ali akutno izpostavljenost toksičnim kovinam. Poleg dejavnikov, ki smo jih vključili kot kovariate, vpliva na koncentracije kovin še mnogo drugih genetskih dejavnikov in vplivov okolja (prehrana, poklicna izpostavljenost, življenjski stil) ter individualne značilnosti posameznika (imunološki dejavniki, pridružene bolezni). V napovedni model za identifikacijo posameznikov, ki so nagnjeni k povečani občutljivosti na toksične kovine, bi bilo potrebno vključiti vse dejavnike, ki določajo toksikološki odgovor. Posebno pozornost je potrebno nameniti nosečnicam z genetskimi predispozicijami.

5 SKLEP

V našem raziskovalnem delu smo poskušali ugotoviti povezanost delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* ter polimorfizma *GSRint3* (A>G) s koncentracijami toksičnih kovin v laseh (hHg, hMeHg) in krvi (mCd, mHg, mMeHg in mPb) nosečnic ter v popkovnični krvi (cCd, cHg, cMeHg in cPb). V raziskavo smo vključili 212 preiskovank.

V raziskovalnem delu smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- pogostnost genotipov v intronu 3 gena *GSR* je naslednja: GG (14,2%), AA (37,7%) in AG (48,1%). Genotipi se porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim načelom.
- pogostnost delecijjskih polimorfizmov je naslednja:
 - homozigotna (*GSTM1/GSTM1*, *GSTT1/GSTT1*) in heterozigotna (*GSTM1/GSTM1*0*, *GSTT1/GSTT1*0*) prisotnost obeh genov: 77 (36,5%) preiskovank
 - homozigotna delecija *GSTM1* gena (*GSTM1*0/GSTM1*0*): 83 (39,3%) preiskovank
 - homozigotna delecija *GSTT1* gena (*GSTT1*0/GSTT1*0*): 21 (10,0%) preiskovank
 - homozigotna delecija obeh genov (*GSTM1*0/GSTM1*0*, *GSTT1*0/GSTT1*0*): 30 (14,2%) preiskovank
- *GSRint3* (A>G) polimorfizem je (mejno) statistično značilno povezan s koncentracijami svinca v krvi preiskovank ($p=0,044$) in popkovnični krvi ($p=0,095$), pri čemer imajo nosilke genotipa GG nižje vrednosti svinca v primerjavi z nosilkami genotipa AA ali AG.
- delecijjski polimorfizem *GSTM1*0* je statistično značilno povezan z zvišanimi koncentracijami svinca ($p=0,004$) v krvi preiskovank in popkovnični krvi ($p=0,051$).
- delecijjski polimorfizem *GSTT1*0* je (mejno) statistično značilno povezan z zvišanimi koncentracijami metilživega srebra v laseh ($p=0,090$) in krvi ($p=0,077$) preiskovank ter popkovnični krvi ($p=0,028$).
- kombinacija obeh delecijjskih polimorfizmov je statistično značilno povezana z koncentracijo svinca ($p=0,029$) v krvi preiskovank, ob vključitvi kovariat pa tudi z

koncentracijami metilživega srebra v krvi in laseh preiskovank ter popkovnični krvi. Koncentracije navedenih elementov dosegajo pri preiskovankah z obema delecijama najvišje vrednosti.

- kombinacija obeh delecijaskih polimorfizmov je statistično značilno povezana z zvišanimi koncentracijami kadmija v popkovnični krvi (Kruskal-Wallis test, $p=0,032$). Preiskovanke z delecijo obeh genov so imele najvišje vrednosti kadmija v popkovnični krvi.

Omenjene genske spremembe so povezane tudi s koncentracijami esencialnih elementov, kot sta selen in mangan:

- *GSRint3* (A>G) polimorfizem je (mejno) statistično značilno povezan z koncentracijo selena v popkovnični krvi ($p=0,064$) in mangana v krvi preiskovank ($p=0,035$). Nosilke genotipa GG imajo nižje vrednosti selena in mangana.
- delecijaski polimorfizem *GSTT1*0* je statistično značilno povezan z zvišanimi koncentracijami mangana ($p=0,012$) v krvi preiskovank.
- kombinacija obeh delecijaskih polimorfizmov je povezana s koncentracijami mangana v krvi preiskovank. Le-te so pri preiskovankah z obema delecijama značilno višje kot pri nosilkah obeh genov ($p=0,069$).

S statistično analizo smo ugotovili, da med kandidatne genske polimorfizme, ki naj bi bili povezani s presnovo toksičnih kovin in esencialnih elementov, sodijo tudi *GSRint3* (A>G), *GSTT1*0* in *GSTMI*0*. V nadaljnjih raziskavah bi bilo na večjem številu preiskovank smiselno natančneje proučiti povezanost genov, ki sodelujejo pri metabolizmu kovin, saj bi tako dobili zanesljivejše rezultate in natančnejše mehanizme vpletenosti v metabolizem kovin. Še posebno pozornost bi namenili študiji povezanosti polimorfizma *GSTT1*0* z nevrološkim statusom otrok in koncentracijami nevrotoksičnega metilživega srebra. Z znanim genetskim profilom bi ugotovili, katere rizične skupine so občutljivejše na izpostavljenost toksičnim kovinam.

6 LITERATURA

1. Klaassen CD: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th Edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 931 – 979.
2. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 39-100.
3. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina. Tretja izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana 2005: 1443-1508.
4. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 675-729.
5. Saper R: Heavy Metal Content of Ayurvedic Herbal Medicine Products. JAMA 2004; 292: 2868-2873.
6. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 599-643.
7. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 445-486.
8. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 139.
9. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 783-807.
10. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 645-674.
11. Klaassen CD: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th Edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 149 – 150.
12. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 213-249.
13. Harada M: Congenital Minamata Disease: Intrauterine Methylmercury Poisoning. Birth Defects Res A Clin Molecular Teratol 2010; 88: 906-909.
14. Grandjean P, Herz KT: Methylmercury and Brain Development: Imprecision and Underestimation of Developmental Neurotoxicity in Humans. Mt Sinai J Med 2011; 78:107–118.
15. Pugach S, Clarkson T: Prenatal mercury exposure and postnatal outcome: clinical case report and analysis. Clin Toxicol 2009; 47: 366–370.

16. Tian L, Zhao Y, Wang X, Gu J, Sun Z, Zhang Y, Wang J: Effects of Gestational Cadmium Exposure on Pregnancy Outcome and Development in the Offspring at Age 4.5 Years. *Biol Trace Elem Res* 2009; 132: 51–59.
17. 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* 2001; 7: 332-340.
18. Mistry HD, Wilson V, Ramsay MM, Symonds ME, Pipkin FB: Reduced Selenium Concentrations and Glutathione Peroxidase Activity in Preeclamptic Pregnancies. *Hypertension* 2008; 52: 881-888.
19. Wood RJ: Manganese and birth outcome. *Nutr Rev* 2009; 67: 416-420.
20. Šuput D, Kamarić L: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001: 15-36.
21. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL: Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009; 390: 191-214.
22. Klaassen CD: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th Edition, McGraw-Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 284-304.
23. Wang W, Ballatori N: Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 335-355.
24. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00390>; 12.10. 2011
25. Satoh N, Watanabe N, Kanada A, Sugaya-Fukasawa M, Hisatomi H: Expression of Glutathione Reductase Splice Variants in Human Tissues. *Biochem Genet* 2010; 48: 816-821.
26. Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S in sod.: Tagging Single-Nucleotide Polymorphisms in Antioxidant Defense Enzymes and Susceptibility to Breast Cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 1225-1233.
27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2978663; 12.10. 2011
28. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09488>; 12.10.2011
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2944>; 12.10.2011
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2952>; 19.09 2011
31. <http://www.uniprot.org/uniprot/P30711>; 19.09 2011

32. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK in sod.: Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1239-1248.
33. Chang X, Jin T, Chen L, Nordberg M, Lei L: Metallothionein I Isoform mRNA Expression in Peripheral Lymphocytes as a Biomarker for Occupational Cadmium Exposure. *Exp Biol Med* 2009; 234: 666-672.
34. Miura N: Individual Susceptibility to Cadmium Toxicity and Metallothionein Gene Polymorphisms: with References to Current Status of Occupational Cadmium Exposure. *Ind Health* 2009; 47: 487–494.
35. McAleer MF, Tuan RS: Metallothionein Protects Against Severe Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Human Trophoblastic Cells. *In Vitro Mol Toxicol* 2001; 14: 219-231.
36. Kawano Y, Furukawa Y, Kawano Y, Abe W, Hirakawa T, Narahara H: Cadmium chloride induces the expression of metallothionein mRNA by endometrial stromal cells and amnion-derived (WISH) cells. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 71: 240-244.
37. Yang K, Julan L, Rubio F, Sharma A, Guan H: Cadmium reduces 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E135–E142.
38. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007: 120-127.
39. Onalaja AO, Claudio L: Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 23–28.
40. Scinicariello F, Murray HE, Moffett DB, Abadin HG, Sexton MJ, Fowler BA: Lead and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism: Where Does It Lead? A Meta-Analysis. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 35–41.
41. Rezende VB, Amaral JH, Quintana SM, Gerlach RF, Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE: Vitamin D receptor haplotypes affect lead levels during pregnancy. *Sci Total Environ* 2010; 408: 4955-4960.
42. Lee BE, Hong YC, Park H, Ha M, Koo BS, Chang N, Roh YM, Kim BN, Kim YJ, Kim BM, Jo SJ, Ha EH: Interaction between *GSTM1/GSTT1* Polymorphism and Blood Mercury on Birth Weight. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 437–443.

43. Engström KS, Strömberg U, Lundh T, Johansson I, Vessby B, Hallmans G, Skerfving S, Broberg K: Genetic Variation in Glutathione-Related Genes and Body Burden of Methylmercury. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 734–739.
44. Mlakar SJ, Osredkar J, Prezelj J, Marc J: Antioxidant enzymes GSR, SOD1, SOD2, and CAT gene variants and bone mineral density values in postmenopausal women: a genetic association analysis. *Menopause* 2011; doi: 10.1097/gme.0b013e31822d5b10.
45. Mlakar SJ, Osredkar J, Prezelj J, Marc J: Opposite effects of *GSTM1* – and *GSTT1* –gene deletion variants on bone mineral density. *Dis Markers* 2011; 31: 279–287.
46. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J: Introduction to Genetic Analysis, 10th Edition, W.H. Freeman & Company, ZDA, 2010: 616 – 618.
47. Baranowska-Bosiackaa I, Gutowska I, Marchlewicz M, Marchetti C, Kurzawski M, Dziedziejko V, Kolasa A, Olszewska M, Rybicka M, Safranow K, Nowacki P, Wiszniewska B, Chlubek D: Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. *Brain Res* 2012; 1435: 56–71.
48. Daggett DA, Oberley TD, Nelson SA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL: Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology* 1998; 128: 191–206.
49. Fuciarelli M, Caccuri A, Francesca M, Ferazzoli F, Piacentini S, Porreca F: Modulation of the GSTT1 activity by the GSTM1 phenotype in a sample of Italian farm-workers. *Arch Toxicol* 2009; 83: 115–120.
50. Gundacker C, Komarnicki G, Jagiello P, Gencikova A, Dahmen N, Wittmann KJ, Gencik M: Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. *Sci Total Environ* 2007; 385: 37–47.
51. Bhattacharya S, Bose S, Mukhopadhyay B, Sarkar D, Das D, Bandyopadhyay J in sod.: Specific binding of inorganic mercury to Na(+)-K(+)-ATPase in rat liver plasma membrane and signal transduction. *Biometals* 1997; 10: 157–62.
52. Custodio HM, Broberg K, Wennberg M, Jansson J-H, Vessby B, Hallmans G in sod.: Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention. *Arch Environ Health* 2004; 59: 588–595.

53. Custodio HM, Harari R, Gerhardsson L, Skerfving S, Broberg K: Genetic influences on the retention of inorganic mercury. *Arch Environ Occup Health* 2005; 60: 17–23.
54. Zusterzeel PL, Visser W, Peters WH, Merkus HW, Nelen WL, Steegers EA: Polymorphism in the Glutathione S-transferase P1 Gene and Risk for Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 50-54.
55. Holcer NJ, Vitale K, Marić AS, Brumen V, Mustajbegović J, Andabaka D: Fish consumption and mercury body burden in women of reproductive age from urban area in Croatia. *Water Treatment Technologies for the Removal of High-Toxicity Pollutants. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security*, 2010, 29-39, DOI: 10.1007/978-90-481-3497-7_3.
56. Vinayagamoorthy N, Krishnamurthi K, Devi SS, Naoghare PK, Biswas R, Biswas AR, Pramanik S, Shende AR, Chakrabarti T: Genetic polymorphism of CYP2D6*2 C? T 2850, GSTM1, NQO1 genes and their correlation with biomarkers in manganese miners of Central India. *Chemosphere* 2010; 81: 1286–1291.

7 PRILOGE

7.1 Značilnosti preiskovank

Preglednica XII: Prikaz značilnosti preiskovank.

	N	Srednja vrednost ± SD
Starost (leta)		
< 30 let	79	30,42 ± 4,708
30-35 let	80	
> 35 let	24	
ITM pred nosečnostjo (kg/m²)		
< 18,5	10	23,167 ± 4,3124
18,5 - 24, 9	133	
enako ali več kot 25	40	
Kovine (ng/g)		
mMn	205	16,0351 ± 6,79338
mSe	205	92,3893 ± 21,99207
mCd	205	0,6492 ± 0,63329
mPb	205	13,8021 ± 9,43285
cMn	195	33,4930 ± 14,73712
cSe	195	97,0744 ± 21,00226
cCd	195	0,1067 ± 0,10773
cPb	195	9,1457 ± 5,00713
mHg	211	2,8108 ± 2,62549
mMeHg	48	5,2602 ± 3,63917
cHg	196	4,3381 ± 4,52877
cMeHg	44	9,2305 ± 6,20147
hHg	212	865,2877 ± 1132,03104
hMeHg	44	2073,7500 ± 1386,30788
Kadilski status		
nekadilka	109	
kadilka	14	
bivša kadilka (kadila 1-5 let)	9	
bivša kadilka (kadila 6-10 let)	20	
bivša kadilka (kadila 11 let ali več)	22	

Razlaga okrajšav: **ITM**, indeks telesne mase; **SD**, standardna deviacija; **N**, število vzorcev; **m/c/h**, koncentracija kovin v materini krvi/popkovnični krvi/laseh.

Preglednica XIII: Pogostnost preiskovanih polimorfizmov *GSRint3* (A>G), *GSTM1*0*, *GSTT1*0*.

<i>GSRint3</i> (A>G) polimorfizem	N	Odstotek preiskovank
GG	30	14,2 %
AG	102	48,1 %
AA	80	37,7 %
SKUPAJ	212	100 %
<i>GSTM1</i> polimorfizem		
prisotnost <i>GSTM1*0</i>	113	53,6 %
odsotnost <i>GSTM1*0</i>	98	46,4 %
SKUPAJ	211	100 %
<i>GSTT1</i> polimorfizem		
prisotnost <i>GSTT1*0</i>	51	24,2 %
odsotnost <i>GSTT1*0</i>	160	75,8 %
SKUPAJ	211	100 %
Kombinacija <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> polimorfizma		
prisotnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	30	14,2 %
odsotnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	77	36,5 %
samo prisotnost <i>GSTM1*0</i>	83	39,3 %
samo prisotnost <i>GSTT1*0</i>	21	10,0 %
SKUPAJ	211	100 %

7.2 Rezultati genotipizacije

Preglednica XIV: Rezultati genotipizacije.

Rezultati v stolpcu GSR: 0 (genotip GG), 1 (genotip AG) in 2 (genotip AA).

Rezultati v stolpcu GSTM1 in GSTT1: 0 (odsotnost polimorfizma) in 1 (prisotnost polimorfizma).

Rezultati v stolpcu kombinacija: 0 (odsotnost obeh polimorfizmov), 1 (prisotnost *GSTM1**0 in odsotnost *GSTT1**0), 2 (prisotnost *GSTT1**0 in odsotnost *GSTM1**0) in 3 (prisotnost obeh polimorfizmov).

Številka vzorca	GSR	GSTM1	GSTT1	kombinacija	Številka vzorca	GSR	GSTM1	GSTT1	kombinacija
100012	2	premalo vzorca	premalo vzorca	premalo vzorca	100053	1	0	0	0
100013	1	1	0	1	100054	2	0	0	0
100015	1	1	0	1	100055	1	1	0	1
100016	0	1	0	1	100056	1	0	0	0
100017	2	0	1	2	100057	0	1	0	1
100018	1	0	0	0	100058	2	0	0	0
100020	2	0	0	0	100060	1	1	1	3
100021	2	1	1	3	100062	2	0	0	0
100022	1	1	0	1	100063	2	1	0	1
100023	2	0	0	0	100064	1	0	0	0
100024	2	1	1	3	100065	2	1	1	3
100025	0	1	0	1	100066	0	0	0	0
100026	1	1	0	1	100067	1	0	0	0
100027	2	1	0	1	100068	2	0	0	0
100028	2	0	0	0	100069	1	1	1	3
100029	2	1	0	1	100070	1	1	0	1
100030	2	1	0	1	100071	2	1	0	1
100031	1	0	0	0	100072	1	1	0	1
100032	1	1	0	1	100073	1	1	1	3
100033	2	0	0	0	100074	1	1	0	1
100035	2	0	1	2	100075	1	0	0	0
100036	0	1	1	3	100076	1	1	1	3
100037	1	1	0	1	100077	1	1	1	3
100038	0	0	0	0	100078	1	1	0	1
100039	1	1	0	1	100079	1	1	0	1
100040	2	1	0	1	100080	1	0	0	0
100041	1	0	1	2	100081	1	0	0	0
100042	1	0	1	2	100082	0	0	0	0
100043	1	0	0	0	100083	1	1	0	1
100044	0	0	0	0	100084	1	1	0	1
100045	1	0	1	2	100085	2	1	0	1
100046	2	1	0	1	100086	1	1	0	1
100047	1	1	1	3	100087	1	0	0	0
100050	2	1	1	3	100088	1	0	1	2
100051	2	1	1	3	100089	1	0	1	2
100052	2	1	0	1	100090	2	0	0	0

100091	2	1	0	1	100137	1	0	0	0
100092	1	0	0	0	100138	1	1	0	1
100093	1	0	1	2	100139	1	1	0	1
100094	1	0	0	0	100140	2	1	0	1
100095	1	0	0	0	100141	2	0	0	0
100096	1	1	0	1	100142	1	1	0	1
100097	1	1	0	1	100143	1	1	0	1
100098	1	0	0	0	100144	2	0	0	0
100099	2	1	1	3	100145	2	0	0	0
100100	1	0	0	0	100146	0	1	0	1
100101	2	1	1	3	100147	0	0	1	2
100102	1	1	0	1	100148	1	0	1	2
100103	2	1	1	3	100149	0	0	1	2
100104	2	1	1	3	100150	1	0	0	0
100105	1	0	0	0	100151	1	1	1	3
100106	1	0	0	0	100152	0	1	0	1
100107	2	0	1	2	100153	1	0	0	0
100108	0	1	1	3	100154	2	1	0	1
100109	2	0	0	0	100155	1	0	0	0
100110	2	1	0	1	100156	2	1	0	1
100111	1	1	0	1	100157	1	0	1	2
100113	1	0	1	2	100158	2	1	0	1
100114	2	0	0	0	100159	2	1	0	1
100115	1	0	0	0	100160	2	1	0	1
100116	2	1	0	1	100161	1	1	0	1
100117	0	1	0	1	100162	2	0	0	0
100118	1	1	1	3	100163	2	1	0	1
100119	1	0	1	2	100164	2	0	0	0
100120	1	1	1	3	100165	2	0	0	0
100121	1	0	0	0	100166	2	1	0	1
100122	1	1	1	3	100167	2	1	0	1
100123	1	1	0	1	100168	2	0	1	2
100124	1	0	0	0	100169	2	0	0	0
100125	1	0	0	0	100170	0	0	0	0
100126	2	0	0	0	100171	2	0	0	0
100127	1	1	0	1	100172	2	0	0	0
100128	1	1	0	1	100173	2	1	0	1
100129	0	1	1	3	100174	0	0	0	0
100130	2	0	0	0	100175	2	0	1	2
100131	0	0	0	0	100176	2	0	1	2
100132	1	1	0	1	100177	1	1	0	1
100133	1	0	0	0	100178	1	1	0	1
100134	2	1	0	1	100179	0	0	0	0
100135	0	0	0	0	100181	1	0	0	0

100136	2	0	0	0	100182	1	1	0	1
100183	1	1	0	1	100228	0	0	1	2
100184	2	0	0	0	100229	1	1	0	1
100185	0	1	1	3	100230	0	0	0	0
100186	0	1	0	1	100231	1	0	0	0
100187	2	1	0	1	100232	1	0	0	0
100188	2	1	1	3	100233	1	1	1	3
100190	1	1	0	1	100234	1	1	0	1
100191	1	1	0	1					
100192	2	0	0	0					
100193	2	0	1	2					
100194	1	1	0	1					
100195	1	1	1	3					
100196	2	1	1	3					
100197	2	1	0	1					
100198	1	1	0	1					
100199	2	0	0	0					
100200	1	1	0	1					
100201	1	1	0	1					
100202	0	0	0	0					
100203	0	0	0	0					
100205	1	0	0	0					
100206	2	0	0	0					
100207	0	1	1	3					
100208	2	0	0	0					
100209	0	1	1	3					
100210	2	1	1	3					
100211	2	1	0	1					
100212	2	1	0	1					
100213	2	1	0	1					
100214	0	1	0	1					
100215	1	1	0	1					
100216	1	0	0	0					
100217	2	1	0	1					
100218	1	0	0	0					
100219	1	0	0	0					
100220	2	0	0	0					
100221	0	0	1	2					
100222	1	0	0	0					
100223	2	1	0	1					
100224	2	1	0	1					
100225	1	1	0	1					
100226	1	1	0	1					
100227	1	0	0	0					

7.3 Statistična analiza polimorfizma *GSRint3* (A>G)

Preglednica XV: Povzetek rezultatov testa ANOVA za polimorfizem *GSRint3* (A>G).

Spremenljivka	p	N
lnmMn	0,035	204
mSe	0,213	204
lnmCd	0,793	204
lnmPb	0,044	204
cMn	0,235	194
cSe	0,064	194
lncPb	0,095	194
lnmHg	0,570	210
mMeHg	0,937	47
lncHg	0,951	195
lncMeHg	0,736	43
lnhHg	0,186	211
lnhMeHg	0,978	43

Preglednica XVI: Povzetek rezultatov LSD Post Hoc testa za polimorfizem *GSRint3* (A>G).

		lnmMn	lnmPb	cSe	lncPb
genotip GG	genotip AG	0,099	0,331	0,021	0,084
	genotip AA	0,011	0,024	0,042	0,030
genotip AG	genotip GG	0,099	0,331	0,021	0,084
	genotip AA	0,161	0,057	0,769	0,467
genotip AA	genotip GG	0,011	0,024	0,042	0,030
	genotip AG	0,161	0,057	0,769	0,467

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti elementov glede na genotip GG, AG ali AA.

		mMn	mSe	mCd	mPb	cMn	cSe	cCd	cPb	hHg	hMeHg	mHg	mMeHg	cHg	cMeHg
genotip GG	SV	14,0966	88,0690	0,6872	11,4600	29,0115	88,1769	0,1350	7,3538	824,7000	1924,8333	2,6930	4,9750	3,9462	7,5850
	N	29	29	29	29	26	26	26	26	30	6	30	6	26	6
	SD	6,29957	22,56090	0,64252	5,49447	11,81959	16,39076	0,22607	3,28455	676,67943	699,57599	1,65668	1,50856	2,91983	2,83573
genotip AG	SV	15,6990	91,1851	0,6063	13,5810	34,5400	98,8589	0,1038	9,2622	736,0980	2214,8000	2,6549	5,4905	4,3155	10,3938
	N	101	101	101	101	95	95	95	95	102	15	101	19	95	16
	SD	6,29014	22,00616	0,58800	10,59147	16,33426	21,50564	0,07819	5,09441	1032,35932	1905,89751	2,65114	4,55095	4,87467	7,85237
genotip AA	SV	17,2373	95,6813	0,6923	15,0055	33,7235	97,9095	0,1004	9,6258	1045,2250	2020,6087	3,0518	5,1443	4,5027	8,8332
	N	75	75	75	75	74	74	74	74	80	23	80	23	75	22
	SD	7,45985	21,58744	0,69082	8,86521	13,30912	21,25167	0,07162	5,30278	1355,40176	1144,98566	2,88515	3,27848	4,57155	5,55163
Skupaj	SV	16,0351	92,3893	0,6492	13,8021	33,4930	97,0744	0,1067	9,1457	865,2877	2073,7500	2,8108	5,2602	4,3381	9,2305
	N	205	205	205	205	195	195	195	195	212	44	211	48	196	44
	SD	6,79338	21,99207	0,63329	9,43285	14,73712	21,00226	0,10773	5,00713	1132,03104	1386,30788	2,62549	3,63917	4,52877	6,20147

Razlaga okrajšav: **SV**, srednja vrednost (angl. *mean*); **N**, število vzorcev; **SD**, standardna deviacija.

Preglednica XVIII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv polimorfizma *GSRint3* (A>G) na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se).

Spremenljivka	Kovariata							
	lnmMn		mSe		cMn		cSe	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmCd	0,950	204	0,902	204	0,352	187	0,254	187
lnmPb	0,229	204	0,132	204	0,056	187	0,043	187
incPb	0,176	187	0,116	187	0,194	194	0,281	194
lnmHg	0,833	203	0,633	203	0,529	193	0,416	193
mMeHg	0,851	40	0,138	40	0,991	43	0,897	43
incHg	0,967	188	0,680	188	0,759	194	0,504	194
incMeHg	0,668	37	0,232	37	0,921	42	0,708	42
inhHg	0,341	204	0,355	204	0,222	194	0,157	194
inhMeHg	0,885	37	0,673	37	0,826	39	0,561	39

Preglednica XIX: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv polimorfizma *GSRint3* (A>G) na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov.

Spremenljivka	Kovariata							
	kajenje		starost		ITM		kajenje + starost + ITM	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmMn	0,376	167	0,154	176	0,192	176	0,335	163
mSe	0,315	167	0,305	176	0,289	176	0,230	163
inhHg	0,279	173	0,367	182	0,230	182	0,255	169
lnmHg	0,350	172	0,579	181	0,508	181	0,371	168
incHg	0,860	166	0,988	175	0,950	174	0,865	163
inhMeHg	0,991	36	0,975	39	0,918	39	0,937	36
mMeHg	0,990	40	0,986	43	0,995	43	0,988	40
incMeHg	0,861	37	0,834	40	0,908	39	0,893	36
lnmPb	0,410	167	0,212	176	0,301	176	0,598	163
incPb	0,093	165	0,167	174	0,096	173	0,256	162
lnmCd	0,255	167	0,631	176	0,438	176	0,503	163
cMn	0,273	165	0,363	174	0,267	173	0,307	162
cSe	0,106	165	0,058	174	0,040	173	0,102	162

7.4 Statistična analiza delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0*, *GSTT1*0* in kombinacije obeh polimorfizmov

Preglednica XX: Povzetek rezultatov testa ANOVA za delecijjska polimorfizma *GSTM1*0* in *GSTT1*0* ter kombinacijo obeh polimorfizmov.

Spremenljivka	N	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	kombinacija
lnmMn	203	0,012	0,384	0,069
mSe	203	0,398	0,757	0,837
cMn	193	0,452	0,857	0,881
cSe	193	0,962	0,329	0,761
mMeHg	47	0,433	0,077	0,226
lnmCd	203	0,410	0,287	0,524
lnmPb	203	0,004	0,451	0,029
lncPb	193	0,051	0,688	0,269
lnhHg	210	0,957	0,611	0,260
lnhMeHg	43	0,906	0,090	0,174
lnmHg	209	0,719	0,491	0,415
lncHg	194	0,888	0,377	0,286
lncMeHg	43	0,295	0,028	0,117

Preglednica XXI: Povzetek rezultatov LSD Post Hoc testa za delecijjska polimorfizma *GSTM1*0* in *GSTT1*0* ter kombinacijo obeh polimorfizmov.

		lnmMn	lnmPb	lncPb	lncMeHg	cCd	mMeHg	lnhMeHg
odsnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	samo prisotnost <i>GSTM1*0</i>	0,017	0,005	0,117	0,420	0,782	0,772	0,484
	samo prisotnost <i>GSTT1*0</i>	0,387	0,328	0,993	0,282	0,810	0,699	0,982
	prisotnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	0,046	0,041	0,127	0,023	0,001	0,044	0,078
samo prisotnost <i>GSTM1*0</i>	odsnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	0,017	0,005	0,117	0,420	0,782	0,772	0,484
	samo prisotnost <i>GSTT1*0</i>	0,479	0,377	0,317	0,461	0,674	0,808	0,689
	prisotnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	0,811	0,970	0,693	0,056	0,002	0,060	0,028
samo prisotnost <i>GSTT1*0</i>	odsnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	0,387	0,328	0,993	0,282	0,810	0,699	0,982
	samo prisotnost <i>GSTM1*0</i>	0,479	0,377	0,317	0,461	0,674	0,808	0,689
	prisotnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	0,432	0,466	0,251	0,471	0,006	0,276	0,200
prisotnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	odsnost <i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>	0,046	0,041	0,127	0,023	0,001	0,044	0,078
	samo prisotnost <i>GSTM1*0</i>	0,811	0,970	0,693	0,056	0,002	0,060	0,028
	samo prisotnost <i>GSTT1*0</i>	0,432	0,466	0,251	0,471	0,006	0,276	0,200

Preglednica XXII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijekega polimorfizma *GSTM1*0* na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se).

Spremenljivka	Kovariata							
	lnmMn		mSe		cMn		cSe	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmCd	0,845	203	0,476	203	0,637	186	0,614	186
lnmPb	0,039	203	0,006	203	0,002	186	0,002	186
incPb	0,066	186	0,040	186	0,073	193	0,036	193
lnmHg	0,643	202	0,954	202	0,872	192	0,764	192
mMeHg	0,503	40	0,497	40	0,482	43	0,494	43
incHg	0,921	187	0,821	187	0,969	193	0,792	193
incMeHg	0,403	37	0,438	37	0,409	42	0,370	42
inhHg	0,733	203	0,884	203	0,809	193	0,905	193
inhMeHg	0,855	37	0,917	37	0,919	39	0,903	39

Preglednica XXIII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijekega polimorfizma *GSTT1*0* na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se).

Spremenljivka	Kovariata							
	lnmMn		mSe		cMn		cSe	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmCd	0,183	203	0,303	203	0,557	186	0,591	186
lnmPb	0,650	203	0,357	203	0,362	186	0,349	186
incPb	0,946	186	0,882	186	0,623	193	0,948	193
lnmHg	0,681	202	0,706	202	0,269	192	0,172	192
mMeHg	0,046	40	0,077	40	0,035	43	0,039	43
incHg	0,474	187	0,538	187	0,414	193	0,208	193
incMeHg	0,031	37	0,054	37	0,082	42	0,046	42
inhHg	0,819	203	0,824	203	0,374	193	0,257	193
inhMeHg	0,106	37	0,180	37	0,250	39	0,203	39

Preglednica XXIV: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv kombinacije obeh delecijских polimorfizmov na koncentracije toksičnih kovin, ob izključitvi vpliva esencialnih elementov (Mn in Se).

Spremenljivka	Kovariata							
	lnmMn		mSe		cMn		cSe	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmCd	0,562	203	0,579	203	0,782	186	0,794	186
lnmPb	0,191	203	0,035	203	0,018	186	0,017	186
lncPb	0,337	186	0,239	186	0,321	193	0,224	193
lnmHg	0,487	202	0,451	202	0,225	192	0,198	192
mMeHg	0,115	40	0,098	40	0,185	43	0,212	43
lncHg	0,357	187	0,319	187	0,271	193	0,230	193
lncMeHg	0,143	37	0,191	37	0,278	42	0,197	42
lnhHg	0,322	203	0,259	203	0,134	193	0,135	193
lnhMeHg	0,236	37	0,215	37	0,542	39	0,564	39

Preglednica XXV: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijского polimorfizma *GSTM1*0* na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov.

Spremenljivka	Kovariata							
	kajenje		starost		ITM		kajenje + starost + ITM	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmMn	0,002	166	0,001	175	0,001	175	0,004	162
mSe	0,292	166	0,341	175	0,266	175	0,251	162
lnhHg	0,621	172	0,682	181	0,969	181	0,907	168
lnmHg	0,980	171	0,999	180	0,780	180	0,726	167
lncHg	0,931	165	0,873	174	0,977	173	0,804	162
lnhMeHg	0,905	36	0,903	39	0,504	39	0,607	36
mMeHg	0,429	40	0,572	43	0,686	43	0,514	40
lncMeHg	0,281	37	0,370	40	0,845	39	0,586	36
lnmPb	0,017	166	0,002	175	0,001	175	0,003	162
lncPb	0,314	164	0,159	173	0,135	172	0,171	161
lnmCd	0,997	166	0,614	175	0,896	175	0,892	162
cMn	1,000	164	0,843	173	0,830	172	0,957	161
cSe	0,419	164	0,401	173	0,388	172	0,397	161

Preglednica XXVI: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv delecijskega polimorfizma *GSTT1*0* na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov.

Spremenljivka	Kovariata							
	kajenje		starost		ITM		kajenje + starost + ITM	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmMn	0,974	166	0,666	175	0,601	175	0,997	162
mSe	0,779	166	0,983	175	0,797	175	0,889	162
lnhHg	0,713	172	0,774	181	0,585	181	0,745	168
lnmHg	0,553	171	0,512	180	0,357	180	0,678	167
lncHg	0,500	165	0,385	174	0,274	173	0,554	162
lnhMeHg	0,071	36	0,015	39	0,009	39	0,055	36
mMeHg	0,024	40	0,011	43	0,010	43	0,020	40
lncMeHg	0,017	37	0,005	40	0,002	39	0,012	36
lnmPb	0,781	166	0,547	175	0,616	175	0,515	162
lncPb	0,574	164	0,550	173	0,566	172	0,413	161
lnmCd	0,579	166	0,406	175	0,461	175	0,441	162
cMn	0,776	164	0,959	173	0,985	172	0,755	161
cSe	0,277	164	0,301	173	0,331	172	0,277	161

Preglednica XXVII: Povzetek rezultatov testa ANCOVA. Vpliv kombinacije obeh delecijskih polimorfizmov na koncentracije kovin, ob izključitvi vpliva kajenja, starosti, ITM, posamično in v kombinaciji vseh treh parametrov.

Spremenljivka	Kovariata							
	kajenje		starost		ITM		kajenje + starost + ITM	
	p	N	p	N	p	N	p	N
lnmMn	0,012	166	0,010	175	0,011	175	0,022	162
mSe	0,753	166	0,820	175	0,722	175	0,718	162
lnhHg	0,185	172	0,246	181	0,439	181	0,519	168
lnmHg	0,351	171	0,458	180	0,548	180	0,656	167
lncHg	0,234	165	0,231	174	0,293	173	0,497	162
lnhMeHg	0,299	36	0,100	39	0,045	39	0,198	36
mMeHg	0,098	40	0,071	43	0,065	43	0,095	40
lncMeHg	0,060	37	0,039	40	0,020	39	0,083	36
lnmPb	0,108	166	0,022	175	0,012	175	0,022	162
lncPb	0,722	164	0,509	173	0,465	172	0,373	161
lnmCd	0,845	166	0,800	175	0,893	175	0,739	162
cMn	0,954	164	0,946	173	0,981	172	0,960	161
cSe	0,563	164	0,573	173	0,530	172	0,513	161

Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti elementov glede prisotnost ali odsotnost delecijekega polimorfizma *GSTMI**0.

		mMn	mSe	mCd	mPb	cMn	cSe	cCd	cPb	hHg	hMeHg	mHg	mMeHg	cHg	cMeHg
lisa je vidna (delecija ni prisotna)	SV	14,7547	91,0600	0,5848	12,2436	32,6820	97,2315	0,0930	8,1916	863,5102	1975,5789	2,7399	4,7871	4,1162	8,1120
	N	95	95	95	95	89	89	89	89	98	19	98	21	90	20
	SD	5,57845	20,96337	0,54315	7,77903	16,59625	21,61005	0,06668	3,90638	1145,06375	900,41721	2,29033	2,45171	3,88621	4,68303
lisa ni vidna (delecija je prisotna)	SV	17,1670	93,6798	0,7050	15,1898	34,2842	97,0848	0,1187	9,9435	873,4336	2148,3600	2,8924	5,6281	4,5624	10,1625
	N	109	109	109	109	105	105	105	105	113	25	112	27	105	24
	SD	7,57128	22,93284	0,70284	10,54640	13,02815	20,62659	0,13251	5,69394	1128,55372	1679,82799	2,89868	4,35835	5,03139	7,19647
Skupaj	SV	16,0436	92,4598	0,6491	13,8178	33,5492	97,1521	0,1069	9,1398	868,8246	2073,7500	2,8212	5,2602	4,3565	9,2305
	N	204	204	204	204	194	194	194	194	211	44	210	48	195	44
	SD	6,80900	22,02291	0,63484	9,45337	14,75432	21,02848	0,10795	5,01939	1133,54838	1386,30788	2,62733	3,63917	4,53312	6,20147

Razlaga okrajšav: **SV**, srednja vrednost (angl. *mean*); **N**, število vzorcev; **SD**, standardna deviacija.

Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti elementov glede prisotnost ali odsotnost delecijekega polimorfizma *GSTT1**0.

		mMn	mSe	mCd	mPb	cMn	cSe	cCd	cPb	hHg	hMeHg	mHg	mMeHg	cHg	cMeHg
lisa je vidna	SV	15,8974	92,7331	0,6775	13,7206	33,6557	96,3291	0,0970	9,0530	863,1063	1873,5405	2,8333	4,8453	4,3661	8,2703
	N	154	154	154	154	148	148	148	148	160	37	159	40	149	39
(delecija ni prisotna)	SD	6,83625	22,74847	0,65217	10,00367	14,71773	21,25003	0,06998	4,93818	1029,23843	914,38460	2,41627	2,87829	4,01143	4,73373
	SV	16,4940	91,6180	0,5616	14,1172	33,2065	99,8000	0,1389	9,4191	886,7647	3132,0000	2,7837	7,3350	4,3252	16,7200
lisa ni vidna	N	50	50	50	50	46	46	46	46	51	7	51	8	46	5
	SD	6,77298	19,81205	0,57555	7,59183	15,02974	20,29853	0,18058	5,31894	1423,94039	2683,82830	3,22535	6,07131	5,97203	11,02007
Skupaj	SV	16,0436	92,4598	0,6491	13,8178	33,5492	97,1521	0,1069	9,1398	868,8246	2073,7500	2,8212	5,2602	4,3565	9,2305
	N	204	204	204	204	194	194	194	194	211	44	210	48	195	44
	SD	6,80900	22,02291	0,63484	9,45337	14,75432	21,02848	0,10795	5,01939	1133,54838	1386,30788	2,62733	3,63917	4,53312	6,20147

Razlaga okrajšav: **SV**, srednja vrednost (angl. *mean*); **N**, število vzorcev; **SD**, standardna deviacija.

Preglednica XXX: Povprečne vrednosti elementov za kombinacijo obeh delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0*.

kombinacija		mMn	mSe	mCd	mPb	cMn	cSe	cCd	cPb	hHg	hMeHg	mHg	mMeHg	cHg	cMeHg
lisi sta vidni (deleciji nista prisotni)	SV	14,5527	91,2243	0,5858	11,9023	32,6471	96,8914	0,0944	8,1283	916,7662	1961,8125	2,8566	4,6628	4,2685	7,4356
	N	74	74	74	74	70	70	70	70	77	16	77	18	71	18
	SD	5,70420	21,79118	0,47925	7,82314	17,00347	21,75962	0,07011	3,75965	1182,85173	888,96803	2,25614	1,92363	3,26928	3,08069
lisa le pri GSTT1 (delecija je prisotna le pri GSTM1)	SV	17,1412	94,1288	0,7623	15,4025	34,5608	95,8244	0,0992	9,8828	813,3253	1806,2857	2,8113	4,9945	4,4550	8,9857
	N	80	80	80	80	78	78	78	78	83	21	82	22	78	21
	SD	7,56199	23,65033	0,77224	11,45854	12,35706	20,91034	0,07025	5,69325	867,23450	949,36690	2,57128	3,51257	4,60389	5,77443
lisa le pri GSTM1 (delecija je prisotna le pri GSTT1)	SV	15,4667	90,4810	0,5814	13,4462	32,8105	98,4842	0,0879	8,4247	668,2381	2049,0000	2,3119	5,5333	3,5474	14,2000
	N	21	21	21	21	19	19	19	19	21	3	21	3	19	2
	SD	5,17816	18,21542	0,74041	7,68620	15,43585	21,58624	0,05350	4,51070	995,73942	1166,26626	2,41945	5,26134	5,71630	13,15219
lisi nista vidni (obe deleciji sta prisotni)	SV	17,2379	92,4414	0,5472	14,6031	33,4852	100,7259	0,1748	10,1189	1039,7333	3944,2500	3,1140	8,4160	4,8726	18,4000
	N	29	29	29	29	27	27	27	27	30	4	30	5	27	3
	SD	7,73052	21,17150	0,43316	7,62117	15,02733	19,70741	0,22631	5,80072	1659,30561	3383,27183	3,69118	6,83889	6,19297	12,07518
Skupaj	SV	16,0436	92,4598	0,6491	13,8178	33,5492	97,1521	0,1069	9,1398	868,8246	2073,7500	2,8212	5,2602	4,3565	9,2305
	N	204	204	204	204	194	194	194	194	211	44	210	48	195	44
	SD	6,80900	22,02291	0,63484	9,45337	14,75432	21,02848	0,10795	5,01939	1133,54838	1386,30788	2,62733	3,63917	4,53312	6,20147

Razlaga okrajšav: **SV**, srednja vrednost (angl. *mean*); **N**, število vzorcev; **SD**, standardna deviacija.