

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IVANA JOVIČIĆ
DIPLOMSKA NALOGA

**POVEZANOST SPREMEMB V GENU *GSTP1* S
KONCENTRACIJAMI Hg^{2+} IN MeHg V RAZLIČNIH
BIOLOŠKIH VZORCIH PRI NOSEČNICAH IN
NOVOROJENCIH**

**THE ASSOCIATION BETWEEN CHANGES OF THE *GSTP1*
GENE AND CONCENTRATIONS OF Hg^{2+} AND MeHg IN
DIFFERENT BIOLOGICAL SAMPLES OF MOTHERS AND
NEWBORNS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm.. V diplomski nalogi smo analizirali vzorce in uporabili podatke, zbrane v evropskem projektu PHIME, sofinanciranem v 6. Okvirnem programu. Slovenska partnerja v tem projektu sta bila Oddelek za okoljsko kemijo na Inštitutu Jožef Štefan ter Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo iz Univerzitetnega Kliničnega Centra v Ljubljani. Iz Hrvaške je v projektu PHIME sodelovala Klinika za ginekologijo in porodništvo iz Kliničnega bolnišničnega centra v Reki.

Zahvala

Rada bi se zahvalila mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici asist. dr. Simoni Jurković Mlakar, mag. farm. za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju. Posebna zahvala gre družini, ki mi je študij omogočila ter me pri njem spodbujala. Iskrena hvala tudi fantu Luki za razumevanje in podporo ter vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani.

Izjava

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

Ljubljana, 2013

Ivana Jovičić

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	viii
ABSTRACT	x
SEZNAM OKRAJŠAV	xii
1 UVOD.....	1
1.1 Toksične kovine.....	1
1.2 Živo srebro.....	3
1.2.1 Elementarna oblika živega srebra – Hg ⁰	3
1.2.1.1 Viri izpostavljenosti Hg ⁰	3
1.2.1.2 Farmakokinetika Hg ⁰	4
1.2.1.3 Znaki zastrupitve s Hg ⁰	4
1.2.2 Anorganske oblike živega srebra - Hg ⁺ in Hg ²⁺	5
1.2.2.1 Viri izpostavljenosti Hg ⁺ in Hg ²⁺	5
1.2.2.2 Farmakokinetika Hg ⁺ in Hg ²⁺	5
1.2.2.3 Znaki zastrupitve s Hg ⁺ in Hg ²⁺	6
1.2.3 Organske živosrebrove spojine.....	7
1.2.3.1 Viri izpostavljenosti MeHg.....	7
1.2.3.2 Farmakokinetika MeHg.....	7
1.2.3.3 Znaki zastrupitve z MeHg.....	8
1.2.3.4 Tiomersal – spojina z EtHg.....	8
1.3. Zaščita pred toksičnimi učinki živega srebra.....	9
1.3.1 Glutation.....	9
1.3.2 Glutation S-tranferaza.....	11
1.3.2.1 Glutation S-transferaza pi.....	11
1.4 Prehajanje živosrebrovih spojin preko placente.....	13
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 Preiskovanci in vzorci.....	17

3.2	Določanje koncentracij Hg^{2+} in MeHg	17
3.3	Določanje koncentracije ostalih izbranih kovin in PUFA	18
3.4.	Izolacija DNK.....	19
3.5.	Alelna diskriminacija z uporabo specifičnih hidrolizirajočih sond	20
3.5.1	Reagenti	21
3.5.2	Pripomočki in naprave.....	22
3.5.3	Priprava vzorcev in potek qPCR reakcije.....	23
3.6	Statistična analiza podatkov	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1	Določanje genotipov za izbrana polimorfizma.....	27
4.2	Testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja v naši populaciji za oba polimorfizma	30
4.3.	Ugotavljanje in primerjava genotipskih frekvenc za oba polimorfizma v naših in drugih populacijah po svetu.....	31
4.4	Ocena kliničnega pomena polimorfizmov v genu GSTP1	32
4.4.1	Analiza povezanosti polimorfizma Ala114Val pri nosečnicah s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v različnih bioloških vzorcih	32
4.4.2	Analiza povezanosti polimorfizma Ile105Val pri nosečnicah s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v različnih bioloških tkivih.....	34
4.4.2.1	Testiranje vpliva kovariat pri ugotavljanju povezanosti polimorfizma Ile105Val ter koncentracij Hg^{2+} v materinem mleku.....	37
4.4.3	Analiza povezanosti kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri nosečnicah s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v različnih bioloških vzorcih	38
4.4.4	Ugotavljanje povezanosti polimorfizmov Ala114Val ter Ile105Val pri materah in njihovih novorojencih s koncentracijo Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi.....	39
4.4.5	Ugotavljanje povezanosti polimorfizma Ala114Val s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ter v urinu novorojencev	39
4.4.6	Ugotavljanje povezanosti polimorfizma Ile105Val s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ter v urinu novorojencev	41
4.4.7	Ugotavljanje povezanosti kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi novorojencev.....	43
4.4.8	Ostali statistično značilni rezultati.....	45

4.4.8.1	Povezava polimorfizma Ala114Val ter koncentracij selena v popkovnični krvi pri slovenskih novorojencih	46
4.4.8.2	Povezava polimorfizma Ala114Val ter koncentracij mangana v venski krvi pri nosečnicah	48
4.4.8.3	Povezava kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val ter koncentracij cinka v venski krvi pri nosečnicah.....	51
5	ZAKLJUČEK	53
6	LITERATURA	55
7	PRILOGE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema farmakokinetike toksičnih kovin.	2
Slika 2: Osnovne reakcijske poti glutationa.....	10
Slika 3: Aminokislinsko zaporedje proteina GSTP.....	12
Slika 4: Medresični prostor in horionske resice.....	13
Slika 5: Najpogostejši prenašalci placent.....	13
Slika 6: Grafični prikaz principa vezave sonde na specifično zaporedje DNK ter njenega delovanja.....	21
Slika 7: Fluorescenčni krivulji po zaključeni qPCR reakciji 1.....	27
Slika 8: Fluorescenčni krivulji po zaključeni qPCR reakciji 2.....	28
Slika 9: Fluorescenčni krivulji po zaključeni qPCR reakciji 3.....	28
Slika 10: Prikaz fluorescenčnih krivulj 98 vzorcev po zaključenih qPCR reakcijah.	29
Slika 11: Razsevni graf 98 vzorcev po zaključenih qPCR reakcijah.....	29
Slika 12: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij milkHg od polimorfizma Ile105Val pri materah.	35
Slika 13: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije MuHg od polimorfizma Ile105Val pri materah.	36
Slika 14: Kvartilni diagram rezultatov odvisnosti koncentracij BuHg od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri hrvaških novorojencih.	41
Slika 15: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij BuHg od genotipa za polimorfizem Ile105Val pri hrvaških novorojencih.	42
Slika 16: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije CbHg od kombinacije genotipov polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri hrvaških novorojencih.	44
Slika 17: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbSe od genotipov polimorfizma Ala114Val pri slovenskih novorojencih.....	47
Slika 18: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbSe od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri slovenskih novorojencih.....	47
Slika 19: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbHg od genotipov polimorfizma Ala114Val pri slovenskih novorojencih.....	48
Slika 20: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbMeHg od genotipov polimorfizma Ala114Val pri slovenskih novorojencih.....	48
Slika 21: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij MMn od genotipa za polimorfizem	

Ala114Val pri nosečnicah.....	50
Slika 22: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij MHg od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri nosečnicah.....	50
Slika 23: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij MMeHg od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri nosečnicah.....	50
Slika 24: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije MZn od kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri nosečnicah.....	52
Slika 25: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije MHg od kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri nosečnicah.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava reakcijske zmesi za identifikacijo SNPa Ala114Val	22
Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za identifikacijo SNPa Ile105Val.	22
Preglednica III: Reakcijski pogoji za obe qPCR reakciji.	25
Preglednica IV: Testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja v naši populaciji za polimorfizem Ala114Val.....	30
Preglednica V: Testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja v naši populaciji za polimorfizem Ile105Val.....	31
Preglednica VI: Genotipske frekvence za oba polimorfizma v naših in drugih populacijah po svetu.....	31
Preglednica VII: Primerjava vrednosti χ^2 in P med združeno slovensko in hrvaško populacijo ter ostalimi raziskanimi populacijami.....	32
Preglednica VIII: Rezultati ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ala114Val pri materah.....	34
Preglednica IX: Rezultati ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ile105Val pri materah.	35
Preglednica X: Rezultati ANCOVA testiranja z izbranimi kovariatami za povezavo med polimorfizmom Ile105Val in koncentracijami milkHg ter vrednost korelacije kovariat z milkHg pri materah.....	37
Preglednica XI: Rezultati ANOVA testov za kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri materah.	38
Preglednica XII: Rezultati ANOVA testov za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val za matere in otroke po parih.....	39
Preglednica XIII: Pregled rezultatov ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ala114Val pri novorojencih.....	40
Preglednica XIV: Pregled rezultatov ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ile105Val pri novorojencih.	42
Preglednica XV: Rezultati ANOVA testiranj za kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri novorojencih.....	43
Preglednica XVI: Rezultati ANCOVA testiranja za povezavo med kombinacijo	

polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val in koncentracijami CbHg pri hrvaških novorojencih. S krepkim tiskom smo označili statistično značilne rezultate	45
Preglednica XVII: Rezultat testiranj ANOVA in ANCOVA z izbranimi kovariatami za povezavo med polimorfizmom Ala114Val ter koncentracijami CbSe pri slovenskih novorojencih	46
Preglednica XVIII: Rezultati ANOVA in ANCOVA testiranj z izbranimi kovariatami za povezavo polimorfizma Ala114Val ter koncentracij MMn pri nosečnicah.	49
Preglednica XIX: Rezultati ANOVA in ANCOVA testiranja z izbranimi kovariatami za povezavo med kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val ter koncentracijami MZn pri nosečnicah.	51
Preglednica XX: značilnosti nosečnic.....	61
Preglednica XXI: Rezultati genotipizacije za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val pri preiskovani populaciji.	62
Preglednica XXII: Frekvence genotipov za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val.	74
Preglednica XXIII: Pregled rezultatov ANOVA in ANCOVA testiranj za statistično neznačilne povezave med polimorfizmi Ala114Val oziroma Ile105Val ter koncentracij Hg ²⁺ in MeHg v izbranih bioloških tkivih.	75
Preglednica XXIV: Pregled rezultatov ANOVA testov za statistično neznačilne povezave med polimorfizmi Ala114Val oziroma Ile105Val ter koncentracijami ostalih kovin (As, Cu, Zn, Cd, Mn, Pb) v izbranih bioloških tkivih.....	84

POVZETEK

Živo srebro spada v skupino kovin, ki izkazujejo predvsem nevrotoksični učinek na človeka. Živo srebro obstaja v treh oksidacijskih stanjih; kot elementarno živo srebro v tekoči ali plinasti obliki (Hg^0) in kot sestavni del anorganskih soli v dveh višjih oksidacijskih stanjih (Hg^+ , Hg^{2+}), pri čemer Hg^{2+} tvori nekaj stabilnih organskih spojin. Živo srebro v vseh oksidacijskih stanjih neposredno zmanjšuje koncentracijo endogenih molekul s prostimi sulfhidrilnimi skupinami, ki imajo antioksidantno funkcijo. Na ta način zniža obrambno sposobnost organizma pred škodljivimi učinki reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Med najpomembnejše endogene mehanizme zaščite pred oksidativnim stresom uvrščamo glutationski (GSH) sistem. Sestavni del tega je encim glutation S-transferaza pi (GSTP), ki katalizira reakcije konjugacije GSH s hidrofobnimi elektrofilni, v našem primeru z živim srebrom ter živosrebrovimi spojinami. V diplomski nalogi smo opazovali povezanost med dvema najpogostejšima enonukleotidnima polimorfizmoma (SNP) na genu *GSTP1*, Ile105Val in Ala114Val s koncentracijami Hg^{2+} in metilživega srebra (MeHg). Osredotočili smo se na dolgotrajno izpostavljenost nizkim koncentracijam Hg^{2+} in MeHg pri občutljivih skupinah ljudi, kot so nosečnice in novorojenci. Povezanost med genotipom in fenotipom smo ocenjevali v bioloških tkivih, kot so venska materina kri, popkovnična kri novorojencev, lasje mater, mleko mater ter urin mater in novorojencev. V raziskovalni del diplomske naloge smo vključili vzorce, zbrane v projektu PHIME, in sicer DNK 608 novorojencev, katerim so bile predhodno izmerjene koncentracije Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ter urinu. V skupini 211 mater smo dodatno imeli tudi podatke o koncentracijah Hg^{2+} in MeHg v venski krvi, laseh, mleku ter urinu. Vzorce DNK smo genotipizirali z metodo kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) s pomočjo specifičnih hidrolizirajočih sond. Statistično smo povezave genotip-fenotip vrednotili za oba proučevana polimorfizma s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v izbranih bioloških vzorcih. Teste smo izvedli za populacijo mater in novorojencev ter za pare mater in novorojencev. Ugotovili smo, da je polimorfizem Ile105Val pri materah statistično značilno povezan s koncentracijami Hg^{2+} v materinem mleku ($p = 0,023$). Koncentracije Hg^{2+} padajo po vrstnem redu genotipov; AA, AG, GG ter so pri genotipu GG statistično značilno najnižje. Pri materah in novorojencih se je povezava polimorfizma Ile105Val s

koncentracijami Hg^{2+} v urinu približala statistično značilnim vrednostim ($p_{\text{matere}} = 0,115$, $p_{\text{novorojenci}} = 0,105$). Koncentracije Hg^{2+} v urinu v obeh primerih padajo po vrstnem redu genotipov; AA, AG, GG. Podobno se je povezava polimorfizma Ala114Val pri novorojencih s koncentracijami Hg^{2+} v urinu približala statistično značilni ($p = 0,144$), koncentracije Hg^{2+} v urinu padajo po vrstnem redu polimorfizmov; CC, CT. Kombinacija obeh proučevanih polimorfizmov pri novorojencih je statistično značilno povezana s koncentracijo Hg^{2+} v popkovnični krvi ($p = 0,018$). Najvišje povprečne koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi so izkazovali novorojenci z genotipom GG za polimorfizem Ile105Val, ne glede na genotipsko podskupino za polimorfizem Ala114Val. Polimorfizem Ala114Val pri materah je statistično značilno povezan s koncentracijami nekaterih kovin v venski krvi, ki lahko vplivajo na raven oksidacijskega stresa; mangan, cink, baker in svinec. V vseh primerih smo statistično značilen vpliv genotipa potrdili po izključitvi vpliva izbranih kovariat, npr. koncentracije esencialnih in toksičnih kovin v pripadajočem biološkem vzorcu. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da so izbrane spremembe v genu *GSTP1* povezane s koncentracijami živega srebra v mleku in urinu mater ter urinu in popkovnični krvi novorojencev. Raziskovane polimorfizme bi lahko vključili v skupino napovednih dejavnikov za občutljivost novorojencev pri prenatalni izpostavljenosti živemu srebru.

ABSTRACT

Mercury is a heavy metal that demonstrates mainly neurotoxic effects on the human organism. Mercury can be found in three oxidation states; its elemental state exists as vapour or liquid (Hg^0), its two higher oxidation states (Hg^+ , Hg^{2+}) are an integral part of inorganic salts, while its mercuric Hg^{2+} state may form several stable organomercuric compounds. All forms of mercury deplete the concentration of endogenous thiol-containing molecules which carry antioxidant actions. Thus the defense capacity of the organism against the harmful effects of reactive oxygen species (ROS) is reduced. The glutathione (GSH) system is one of the main endogenous antioxidant mechanisms. The glutathione S-transferase pi (GSTP) enzyme is a vital part of this system. It catalyzes the conjugation of reduced GSH and hydrophobic electrophilic species that are represented by mercury and its compounds in our thesis. Within our research we estimated the association between two of the most common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *GSTP1* gene, Ile105Val and Ala114Val, and the concentrations of Hg^{2+} and methyl mercury (MeHg). We focused on the long term exposure to low levels of Hg^{2+} and MeHg in vulnerable populations such as pregnant women and their newborn children. We evaluated the relationship between genotype and phenotype in biological samples including maternal venous blood, newborns' cord blood, maternal hair, maternal milk and maternal and newborns' urin. Our research involved DNA samples from 608 newborns that were collected within the PHIME project. They had levels of Hg^{2+} and MeHg in urine and cord blood previously measured. We also had available data of the measurements of Hg^{2+} and MeHg in venous blood, hair, milk and urin of 211 mothers. The genotype of the DNA samples was determined by using the method of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with specific hydrolysis probes. We statistically evaluated the genotype-phenotype relationship for both studied polymorphisms and the concentrations of Hg^{2+} and MeHg in the aforementioned biological samples. We statistically analyzed the population of mothers, the populations of newborns and of mother-child pairs. We found the statistically significant association between mothers' Ile105Val polymorphism and the concentrations of Hg^{2+} in maternal milk ($p = 0,023$). Concentrations of Hg^{2+} decreased in the following genotype order; AA, AG, GG and were significantly lowest among the individuals with the GG genotype. The association between mothers' and newborns' Ile105Val polymorphism

and the concentrations of Hg^{2+} in urine was found to be close to significant ($p_{\text{mothers}} = 0,115$, $p_{\text{newborns}} = 0,105$). In both cases concentrations of Hg^{2+} decreased in the following genotype order: AA, AG, GG. Similarly, the linkage between newborns' Ala114Val polymorphism and concentrations of Hg^{2+} in urine was close to significant ($p = 0,144$). Concentrations decreased in the following genotype order: CC, CT. The association between the combination of both studied polymorphisms in newborns and the concentrations of Hg^{2+} in cord blood was discovered to be significant ($p = 0,018$). The highest Hg^{2+} concentrations were measured among individuals with the GG genotype for the Ile105Val polymorphism regardless of the genotypic subtype for the Ala114Val polymorphism. Mothers' Ala114Val polymorphism was significantly associated with venous blood concentrations of some essential and toxic metals that might have an important effect on oxydative stress levels: manganese, zinc, copper and lead. In every aforementioned case we confirmed the effect of the genotype by excluding the effect of different covariates for example, the concentration of essential and toxic metals in the corresponding biological sample. Based on our results we can conclude that *GSTP1* gene alterations are connected with concentration of mercury in maternal milk and urine, in newborns' urine and in the cord blood. We could include our selected polymorphisms in a group of prognostic factors for infant sensibility to prenatal mercury exposure.

SEZNAM OKRAJŠAV

AAS	atomska absorpcijska spektroskopija
ANCOVA	analiza kovarianc
ANOVA	analiza varianc
BuHg	koncentracija Hg ²⁺ v urinu novorojencev
BuMeHg	koncentracija MeHg v urinu novorojencev
CbAs	koncentracija arzena v popkovnični krvi
CbCu	koncentracija bakra v popkovnični krvi
CbHg	koncentracija Hg ²⁺ v popkovnični krvi
CbPb	koncentracija svinca v popkovnični krvi
CbMeHg	koncentracija MeHg v popkovnični krvi
CbMn	koncentracija mangana v popkovnični krvi
CbSe	koncentracija selena v popkovnični krvi
CbZn	koncentracija cinka v popkovnični krvi
CV-AFS	atomska fluorescenčna spektroskopija hladnih par (" <i>cold vapour atomic fluorescence spectrometry</i> ")
CDK5	od ciklina odvisna kinaza 5 (" <i>cycline-dependent kinase 5</i> ")
CŽS	centralni živčni sistem
EtHg	etilživo srebro
FRET	fluorescenčni prenos resonančne energije (" <i>fluorescence resonance energy transfer</i> ")
GC-ECD	plinska kromatografija s sklopljenim detektorjem za zajetje elektronov (" <i>gas chromatography – electron capture detector</i> ")
GC-FID	plinska kromatografija s plamensko ionizacijskim detektorjem (" <i>gas chromatography – flame ionization detector</i> ")
GIT	gastrointestinalni trakt
GPX	glutation peroksidaza (" <i>glutathione peroxidase</i> ")
GSH	glutation
GSR	glutationski konjugati
GSSG	glutation disulfid

GST	glutation S-transferaze
GSTP	glutation S-transferaza pi
HEB	hematoencefalna bariera
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (" <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ")
HG-AFS	hidridna atomska fluorescenčna spektroskopija (" <i>hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i> ")
HHg	koncentracija Hg ²⁺ v laseh mater
MAs	koncentracija arzena v venski krvi mater
MCd	koncentracija kadmija v venski krvi mater
MCu	koncentracija bakra v venski krvi mater
MeHg	metilživo srebro
MHg	koncentracija Hg ²⁺ v venski krvi mater
milkHg	koncentracija Hg ²⁺ v mleku mater
MMn	koncentracija mangana v venski krvi mater
MnSOD	manganska superoksidna dismutaza
MPb	koncentracija svinca v venski krvi mater
MSe	koncentracija selena v venski krvi mater
MuHg	koncentracija Hg ²⁺ v urinu mater
MZn	koncentracija cinka v venski krvi mater
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline (" <i>polyunsaturated fatty acids</i> ")
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (" <i>reactive oxygen species</i> ")
SNP	enonukleotidni polimorfizem (" <i>single nucleotide polymorphism</i> ")
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (" <i>quantitative polymerase chain reaction</i> ")
TRX	tiodoksin
Zn-SOD	cinkova superoksidna dismutaza

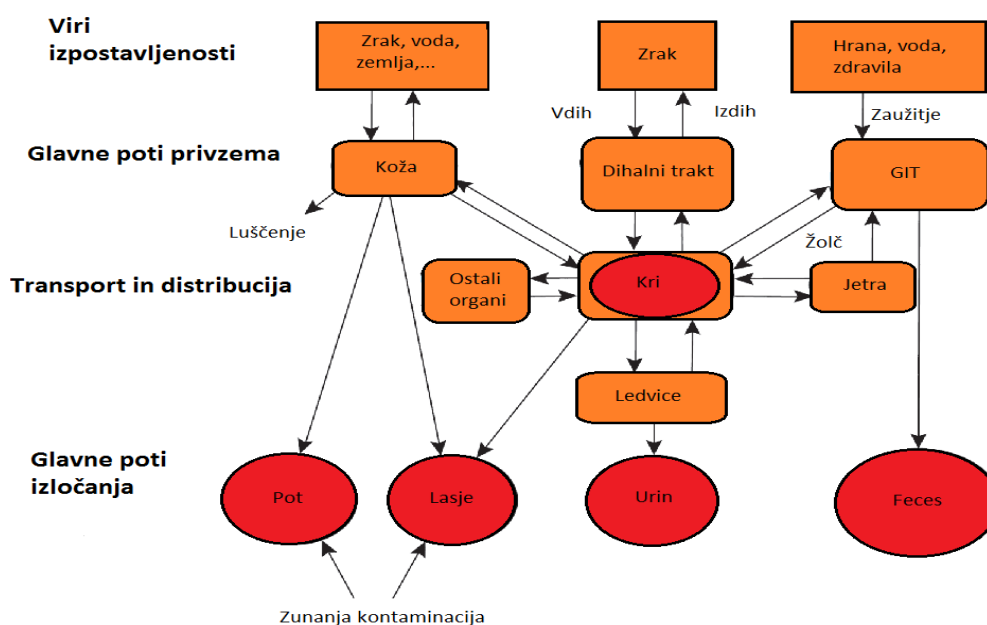
1 UVOD

1.1 Toksične kovine

V periodnem sistemu kar štiri petine ali 80 elementov uvrščamo med kovine (1). Pri tem so pri okrog 30 elementih poročali o toksičnosti za človeka. Med kovinske elemente, kjer beležimo najbolj pogoste ter tudi najbolj raznolike toksične učinke, uvrščamo: berilij, kadmij, krom, svinec, nikelj ter **živo srebro** (2).

Kovine so naravna komponenta zemeljske skorje in so kot take eden izmed najstarejših človeku znanih toksinov (3). Danes tudi človek s svojim delovanjem vpliva na geološke in biološke cikle, ki so neposredno povezani s koncentracijo kovin v vodi, hrani in zraku (4). Vnos zraka z visoko koncentracijo kovin je glavni vir izpostavljenosti na zelo industrializiranih območjih in/ali na območjih z veliko gostoto prometa. Voda je lahko najpomembnejši vir izpostavljenosti kovinam na območjih, kjer je koncentracija kovin naravno visoka v vodi ter rudninah. Hrana je v veliko primerih največji vir kovin, zaradi najrazličnejših razlogov, od slučajne zastrupitve do določenih prehrabnenih navad, kot je povečano uživanje plenilskih rib, v katerih so višje koncentracije toksičnih kovin (5). Poleg naštetega so pri določenih skupinah ljudi pomembni viri toksičnih kovin še amalgamske zalivke zaradi vsebnosti živega srebra in cigaretne dim. Toksične kovine lahko sproščajo tudi nekateri vsajeni medicinski pripomočki. Vir izpostavljenosti lahko predstavlja tudi hemodializa ter nekateri drugi medicinski postopki (6,7,8).

Zastrupitve s kovinami delimo na akutne in kronične. Danes zaradi večje pogostosti, manjšega razumevanja mehanizmov ter težje prepoznavnosti prihaja do bolj poglobljenega raziskovanja kroničnih zastrupitev. Za te je značilna daljša izpostavljenost majhnim količinam toksičnih snovi, pogosto pa se pojavlja tudi akumulacija v katerem od telesnih tkiv in struktur. Največjo pozornost namenjamo dolgoročnim učinkom izpostavljenosti, kot so nevrotoksičnost ter vplivi na ostale pomembne organe ter organske sisteme. Posebna poglavja predstavljajo kancerogenost, mutagenost ter epigenetski učinki (9).



Slika 1: Shema farmakokinetike toksičnih kovin. Na rdeči podlagi so tkiva, katera odvezujemo za meritve vsebnosti kovin (2).

Kljub širokemu naboru toksikoloških lastnosti in učinkov pri različnih kovinah lahko izpostavimo dva splošna neposredna mehanizma delovanja:

- **neposredna inhibicija/aktivacija encima:** večina raziskanih toksičnih kovin kaže visoko afiniteto do funkcionalnih skupin stranskih aminokislinskih verig, najpogosteje pa do sulfhidrilne -SH, karboksilne -COOH in aminske skupine -NH₂. Ko pride do vezave kovine na funkcionalne skupine, ki imajo neposredno pomembno vlogo pri aktivnosti encima, so možne spremembe, ki so ključne pri strukturalni stabilnosti ali pride do sprememb v samem delovanju encima (10). Tako svinec kaže visoko afiniteto do sulfhidrilne funkcionalne skupine. Vezava svinca na encime dehidrataza delta aminolevulinske kisline, sintaza delta aminolevulinske kisline ter ferokelataza vodi do njihove inhibicije, ki se klinično kaže kot mikrocična hipokromna anemija zaradi ovirane sinteze hema (11). Neposredno delovanje toksičnih kovin na encime povzroči inhibicijo antioksidantnih encimov in izčrpanost zalog glutationa, kar vodi v povečan obseg oksidativnega stresa ter v lipidno peroksidacijo. Kot prikazano v primeru, pride do sprememb v beljakovinski presnovi, ki vodijo v raznolike klinične učinke (12).

- **posnemanje in zamenjava esencialnih kovin:** zaradi podobnosti tekmujejo za vezavna mesta, pomembna pri absorpciji, shranjevanju ter neposrednem delovanju esencialnih kovin ter tako ovirajo ali ustavijo procese, pri katerih so le te ključne. Pogosto zamenjajo esencialne kovine, ki delujejo kot kofaktorji ali komponente encimov ter drugih pomembnih bioloških molekul ter na ta način ovirajo njihovo delovanje (10). Kadmij lahko zaseda vezavna mesta, namenjena kalciju zaradi podobne velikosti in enakega oksidacijskega stanja. Tako kadmij lahko aktivira cel spekter od kalmodulina odvisnih encimov, kar pripelje do številnih motenih telesnih funkcij (13). Encim anhidraza ogljikove kisline za delovanje potrebuje cink kot kofaktor. Ob zamenjavi s kobaltom, se aktivnost encima zmanjša za več kot polovico; če kofaktor cink zamenja baker, pa aktivnost encima pade na zgolj 1% (6).

1.2 Živo srebro

Živo srebro ima med kovinami edinstveno lastnost; v elementarni obliki je pri sobni temperaturi in normalnem tlaku v tekočem agregatnem stanju. Pri tem lahko hitro prehaja v plinasto agregatno stanje (živosrebrevi hlapi), ki je s toksikološkega stališča bistveno bolj nevarno od tekoče elementarne oblike.

Živo srebro obstaja v treh oksidacijskih stanjih. Prvo predstavlja že omenjeno elementarno živo srebro v tekoči ali plinasti obliki (Hg^0). Nadalje nastopa kot sestavni del različnih anorganskih soli v dveh višjih oksidacijskih stanjih (Hg^+ , Hg^{2+}), pri čemer atom živega srebra izgubi enega oziroma dva elektrona. Pri tem oksidacijska oblika Hg^{2+} tvori nekaj stabilnih organskih spojin z vezavo na enega ali dva ogljikova atoma (14).

1.2.1 Elementarna oblika živega srebra – Hg^0

1.2.1.1 Viri izpostavljenosti Hg^0

Poleg naravnega izvora (vulkanski izbruhi, predvsem pa izhlapevanje iz površine zemeljske skorje) in pri poklicni izpostavljenosti (obdelava kovinskih rud in uporaba kovin, pridobivanje zlata, izdelava cementa...), elementarno živo srebro v omembe vrednih količinah najdemo v termometrih, termostatih, amalgamskih zobnih zalivkah ter v barvah z

dodanim živim srebrom. Iz vseh naštetih virov lahko živo srebro prehaja v nevarnejše plinasto agregatno stanje (15). V Evropski uniji se čedalje bolj omejuje in nadzira uporaba živega srebra v industrijske namene in pri različnih končnih izdelkih (16). Predmet intenzivnih razprav pa je še vedno precej razširjena uporaba amalgamskih zobnih zalivk, zlasti po izsledkih nekaterih raziskav, ki dokazujejo, da amalgamske zalivke vplivajo na telesno obremenjenost z živim srebrom, najizraziteje pri otrocih (17).

1.2.1.2 Farmakokinetika Hg⁰

Absorpcija: preko GIT je absorpcija tekoče oblike zanemarljiva (okrog 0'01%), tudi živosrebrovi hlapci se v GIT težko sproščajo in toksikološko niso pomembni. Nasprotno se živosrebrovi hlapci hitro in učinkovito absorbirajo v alveolih (okrog 80%).

Distribucija: gre za majhno in lipofilno zvrst, ki relativno enostavno prehaja v celice, lahko prehaja tako hematoencefalno bariero (HEB) kot placento; kopiči se predvsem v centralnem živčnem sistemu (CŽS), zlasti v možganih, po oksidaciji v celicah pa tudi v ledvicah (18).

Metabolizem: v celicah (zlasti v pljučnih celicah, v eritrocitih, ter v jetrnih celicah) hitro pride do oksidacije v divalentno obliko z encimom katalaza v prisotnosti vodikovega peroksida (H₂O₂). V manjši meri je možna tudi obratna pot: redukcija v monovalentno obliko ter celo nazaj v hlapno elementarno obliko.

Eliminacija: delno se izloči preko pljuč z dihanjem (okrog 7%); delež, ki se je v procesih metabolizma oksidiral, pa se izloča z urinom in fecesom (19).

1.2.1.3 Znaki zastrupitve s Hg⁰

Pri akutni zastrupitvi ob vdihovanju živosrebrovih hlapov hitro sledijo bolečine v prsih, težko dihanje, kašelj ter izkašljevanje krvi. Simptomi se lahko stopnjujejo do intersticijskega vnetja pljuč, ki lahko vodi v smrt. Vendar je CŽS tisti organski sistem, kjer se kažejo ključni učinki živosrebrovih hlapov na organizem. Subakutna izpostavljenost povzroča psihotične reakcije, za katere so značilni delirij, halucinacije ter samomorilske težnje (20). Kronična izpostavljenost se najpogosteje kaže kot trojček znakov: povečana vznemirjenost in razdražljivost, drhtenje (tremor) ter vnetje dlesni (gingivitis), pojavlja pa se lahko še širok razpon znakov, ki se kažejo zlasti kot motnje razpoloženja, čustvovanja ter osebnosti.

Povečana izpostavljenost elementarnemu živemu srebru lahko vodi do simptomov, podobnim dermatitisu; rožnati izpuščaji na okončinah, srbečica, v hujših primerih pa tudi mravljinčenje ter bolečina (15).

Vplivi na plod preko izpostavljenosti matere: predvsem raziskave na poskusnih živalih jasno kažejo, da je razvijajoče se živčno tkivo ploda na vplive živosrebovih hlapov najbolj občutljivo. Pojavljajo se podobne razvojne motnje, kot jih lahko opazujemo pri plodih, ki so izpostavljeni metilživemu srebru, zlasti v odmerkih, ki pri materi povzročajo pojav znakov zastrupitve (21). Pri podganjih materah se je toksičnost pokazala pri odmerkih med 4 in 8 mg/m³, ob izpostavljanju elementarnemu živemu srebru med šestim in petnajstim dnevom brejosti. Klinični znaki so vključevali padec telesne teže ter pojav blage nefrotoksičnosti (22).

1.2.2 Anorganske oblike živega srebra - Hg⁺ in Hg²⁺

1.2.2.1 Viri izpostavljenosti Hg⁺ in Hg²⁺

Večja izpostavljenost je značilna za specifična delovna okolja (kloralkalna industrija, laboratoriji...), medtem ko splošna populacija prihaja s solmi živega srebra le redko v stik. Dejansko so najpogostejši vir anorganskega srebra oksidoredukcijske spremembe, do katerih prihaja pri metabolizmu elementarnega ali organskega živega srebra. Vir lahko predstavlja tudi metilživo srebro, ki je demetilirano s pomočjo črevesnih mikroorganizmov (15). Poskusi z vsebino kravjega vampa so dokazali, da nekatere vrste bakterij učinkovito demetilirajo metilživo srebro (23). Eno izmed teh vrst bakterij najdemo tudi v človeškem GIT; gre za *Desulfovibrio desulfuricans*, Gram-negativno sulfat-reducirajočo bakterijo (24).

1.2.2.2 Farmakokinetika Hg⁺ in Hg²⁺

Absorpcija: Hg⁺ soli, najpogosteje kloridna sol, je slabo topna v vodi in absorpcija le-teh v GIT je nizka. V prisotnosti proteinov pride do disproporcionacije na Hg⁰ ter Hg²⁺, del slednje pa lahko prehaja v krvni obtok. Absorpcija Hg²⁺-soli v GIT lahko doseže do 15% (26). S pomočjo poskusov na živalih so ugotovili, da se lahko nezanimljiv delež (2-8%) Hg²⁺-soli absorbira skozi kožo (19).

Distribucija: zaradi slabe lipidotopnosti anorganske živosrebove soli ne prehajajo HEB,

vendar se lahko nalagajo v možganih izpostavljenih novorojenčkov, ki nimajo še popolnoma razvite HEB. Anorganske živosrebrove soli prav tako ne prehajajo placent. V največji meri se kopičijo v ledvicah, povišane koncentracije pa lahko ob izpostavljenosti zaznamo tudi v jetrih (15).

Metabolizem: v manjši meri prihaja do dveh ločenih procesov; metilacije preko delovanja bakterij črevesne flore ter redukcijske spremembe do elementarne oblike Hg^0 . Hg^{2+} oblika se z veliko afiniteto veže na aminokislino oziroma aminokislinske verige s sulfhidrilno funkcionalno skupino -SH. Tako lahko pride do vezave Hg^{2+} v jetrih na glutation, vendar velik delež anorganskega živega srebra hitro potuje v ledvice, kjer se z visoko afiniteto veže na cisteinske ostanke proteinov z nizko molekulsko maso ter visoko vsebnostjo cisteina (metalotioneini) (26).

Eliminacija: poteka v glavnem z urinom in fecesom, pri čemer je delež posamezne eliminacijske poti odvisen od velikosti odmerka in dolžine izpostavljenosti živosrebrovi soli. Delež Hg^+ in Hg^{2+} , ki se skozi redukcijske reakcije pretvori v elementarno obliko, se delno izloči preko pljuč. Živosrebrove anorganske soli se izločajo tudi v materino mleko (19).

1.2.2.3 Znaki zastrupitve s Hg^+ in Hg^{2+}

Pri akutni zastrupitvi sprva nastopijo hudi simptomi na GIT, kot so razjede, krvavitve ter nekroza tkiva, ki pogosto vodijo v smrtno nevarna šok ter kolaps krvnega obtoka. Če bolnik preživi prvo fazo zastrupitve, v 24 urah sledi odpoved ledvic zaradi nekroze epitelija proksimalnega tubula, ki vodi v oligurijo, anurijo ter uremijo (25).

Kronične zastrupitve so redke ter so v veliki večini povezane s poklicno izpostavljenostjo, najpogosteje kombinaciji živosrebrovih hlapov ter Hg^{2+} -soli. V teh primerih največjo škodo utrpijo ledvice. Raziskava, v kateri so analizirali vzorce poklicno izpostavljenih posameznikov iz treh držav, je pokazala značilne spremembe celic proksimalnega tubula, kar so lahko opazili predvsem s spremljanjem proteinurije (27). Dolgoročna izpostavljenost živosrebrovim solem vodi v nefritis ter nefrotski sindrom skupaj s poškodbami glomerulnega tkiva (26).

1.2.3 Organske živosrebrove spojine

Najpomembnejša spojina v tej skupini ter tista, kateri se bomo največ posvetili tudi v diplomski nalogi, je **metil živo srebro** (MeHg).

1.2.3.1 Viri izpostavljenosti MeHg

Določene vrste v vodi živečih, zlasti anaerobnih bakterij, vse oblike anorganskega živega srebra z encimsko kataliziranimi procesi pretvarjajo v MeHg (28). Pri tem je določena količina živega srebra v vodah že prisotna zaradi različnih naravnih procesov, ta pa se lahko bistveno poveča zaradi človeških industrijskih dejavnosti (izraziti primeri: industrija pesticidov, fungicidov (Irak - (29)), acetaldehida (Minamata - (30))). Človek je MeHg najbolj izpostavljen preko uživanja morskih sesalcev, predvsem pa rib, zlasti velikih ter plenilskih, pri katerih po pogostosti izstopa tuna (31).

1.2.3.2 Farmakokinetika MeHg

Absorpcija: pri uživanju kontaminiranih rib dosega MeHg v GIT 95% absorpcijo, v primeru izpostavljenosti hlapom, se ti skorajda popolnoma absorbirajo, pri poskusih na živalih pa je absorpcija skozi kožo dosegala med 3 in 5%.

Distribucija: zaradi lipofilnosti se zvrst distribuira po celem telesu, okrog 10% absorbiranega odmerka se absorbira v centralni krvni obtok, kjer se ga več kot 90% veže na hemoglobin v rdečih krvnih celicah. Prehaja tako HEB kot placentno.

Metabolizem: MeHg se prav tako s veliko afiniteto veže na zvrsti, ki imajo sulfhidrilne funkcionalne skupine (proteini, cistein, glutation), vendar je v primerjavi z anorganskim živim srebrom vezava na metalotioneine zanemarljiva. MeHg se počasi demetilira v anorgansko obliko Hg^{2+} . Gre za proces, ki poteka v tkivnih makrofagih, intestinalni flori ter tudi v jetrih fetusa. Demetilacija MeHg poteka tudi v možganih po prehodu HEB, kar naj bi bil eden izmed glavnih mehanizmov nevrotoksičnosti. MeHg se v intestinalni flori demetilira predvsem s pomočjo delovanja že omenjenih naravno prisotnih reducirajočih bakterij, ostali mehanizmi demetilacije pa niso še natančno raziskani. Encimov, ki bi reakcijo demetilacije katalizirali, pri sesalcih še niso našli, natančneje proučujejo morebitne radikalske mehanizme transformacije.

Eliminacija: dnevno telo lahko izloči okrog 1% telesnega bremena MeHg. MeHg vstopa v

enterohepatično kroženje. Izločanje z žolčem poteka zlasti, ko je MeHg vezan na glutation. Znatno delež se ga potem v črevesju reabsorbira. Okrog 90% MeHg se izloča s fecesom, 10% pa z urinom, v obeh primerih v obliki Hg^{2+} (32).

1.2.3.3 Znaki zastrupitve z MeHg

Najbolj izrazite, hkrati pa tudi najbolj proučene simptome zastrupitve z MeHg lahko opazujemo na CZS. Klinični znaki in potek bolezni so odvisni od razvojne dobe, odmerka ter trajanja izpostavljenosti.

Izpostavljenost MeHg fetusa pred rojstvom

Učinki izpostavljenosti MeHg pred rojstvom so najbolj natančno proučeni v že omenjenem primeru mesta Minamata na Japonskem. Med nosečnostjo in porodom matere prizadetih otrok niso izkazovale nobenih znakov zastrupitve. Vir zastrupitve so bile najverjetneje ribe, ki so jih matere uživale, v katerih se je nakopičilo veliko živega srebra zaradi delovanja tovarne acetaldehida. Nepravilnosti pri razvoju so se začele kazati pri okrog šestih mesecih po rojstvu, sprva kot nestabilnost vratu, konvulzije ter nezmožnost sledenja z očmi. Sledil je pojav hudih nevroloških, duševnih in motoričnih simptomov, ki so bili v mnogih prvinah podobni cerebralni paralizi. Nevrološki klinični znaki so raznoliki, kar kaže na generalizirano poškodbo, možgani izpostavljenih otrok pa so že ob rojstvu manjši, potekata procesa atrofije ter hipoplazije celic (33).

Izpostavljenost MeHg v odrasli dobi

Nevrološki znaki, ki se pojavljajo zaradi izpostavljenosti MeHg v odrasli dobi so posledica bolj lokaliziranih poškodb in se najpogosteje kažejo kot periferna nevropatija, motnje govora, vida, sluha, tremor ter različen spekter motenj duševnosti ter razpoloženja (34).

1.2.3.4 Tiomersal – spojina z EtHg

Gre za konzervans, ki ga dodajajo v glavnem cepivom in vsebuje etilživo srebro (EtHg). Znanstveniki se še niso zedinili, ali gre za škodljiv ali nenevaren dodatek. Občutljiva je zlasti uporaba pri otrocih z vidika povzročanja ali povečanja možnosti pojava nevroloških motenj (v ospredju raziskav je zlasti avtizem). Tudi izsledki znanstvenih raziskav si pogosto nasprotujejo, tako da bi bilo verjetno potrebno natančneje proučiti metode izbiranja vzorcev, metode analize ter statističnega vrednotenja podatkov, da bi lahko

ugotovili, zakaj prihaja do takih razlik (35,36).

1.3. Zaščita pred toksičnimi učinki živega srebra

Stabilnostne konstante kompleksov živega srebra ter sulfhidrilne skupine so visoke. Posledično se živo srebro veže na katerokoli prosto sulfhidrilno skupino, pri čemer bo vezava živega srebra na spojino s sulfhidrilno skupino (glutation, cistein, homocistein, metalotionen, albumin) z najvišjo koncentracijo najpogostejša (37).

Kompleks MeHg in cisteina posnema strukturo aminokislina metionin ter lahko preko enakih mehanizmov kot metionin prehaja HEB - gre za enega pomembnih raziskovanih mehanizmov nevrotoksičnosti MeHg, ob spremembah homeostaze kalcija, glutamata ter oksidativnemu stresu (38).

Vendar v splošnem velja, da endogene tiolne spojine vežejo ter prenašajo živosrebrove spojine, s čimer preprečujejo vezavo na ostale funkcionalne proteine ter tako ščitijo pred poškodbami tkiva. Višje kot so koncentracije spojin s sulfhidrilno funkcionalno skupino znotraj celice, boljša je zaščita pred kopičenjem živega srebra, tako in vivo kot in vitro (39).

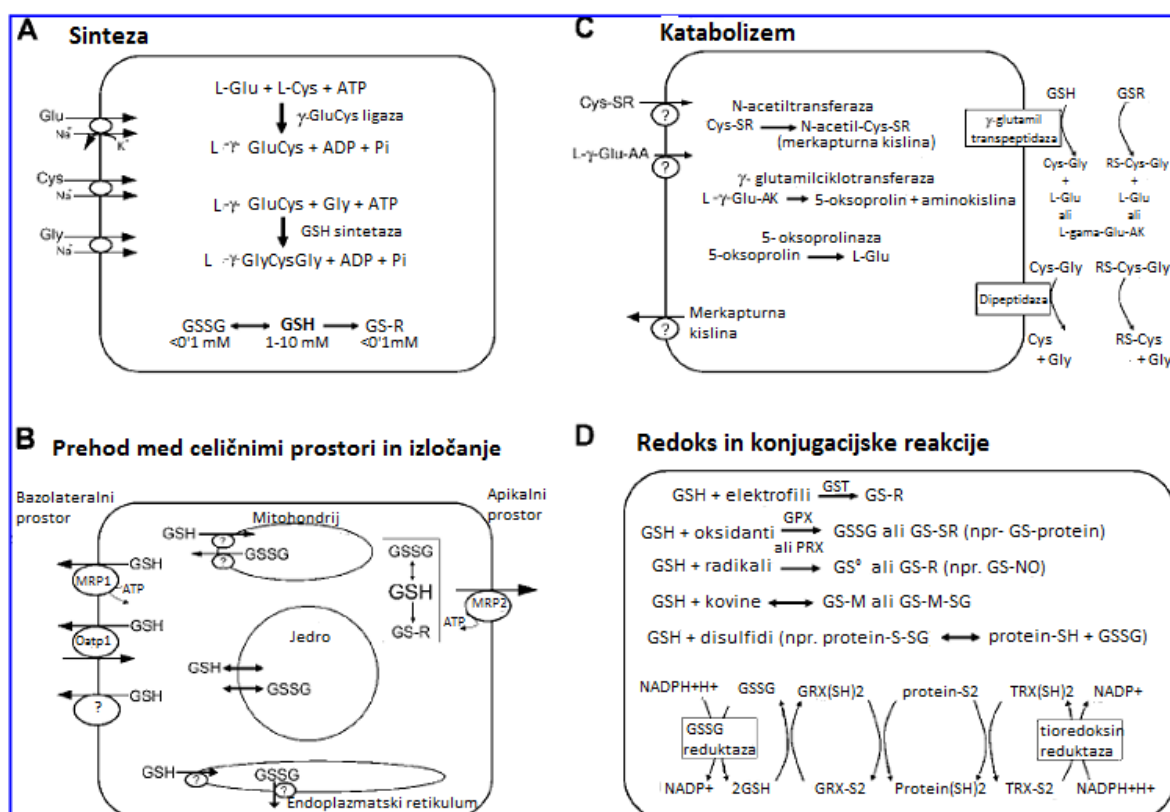
1.3.1 Glutation

Glutation je v sesalskih celicah najbolj pogosta nizkomolekularna spojina, ki vsebuje sulfhidrilno (-SH) funkcionalno skupino. V večini celic ga najdemo v milimolarnih koncentracijah (40). Sinteza poteka v citosolu celice iz aminokislinskih prekurzorjev; glutaminske kisline, cisteina in glicina. V celici je glutation prisoten večinoma v reducirani obliki (GSH > 98%), manj v obliki disulfida (GSSG) oziroma konjugatov (GS-R) (41). Glutation je izredno pomemben del antioksidantnega obrambnega sistema organizma, poleg tega pa ima še druge pomembne funkcije; služi kot skladiščna molekula za aminokislino cistein, shranjuje ter prenaša dušikov oksid (NO), sodeluje pri metabolizmu estrogenov, levkotrienov in prostaglandinov, pri redukciji ribonukleotidov v deoksiribonukleotide, ima vlogo pri delovanju nekaterih transkripcijskih faktorjev (zlasti tistih, ki imajo pomembno vlogo v redoks signalizaciji), pomemben je pri detoksifikaciji mnogih, tako endogenih substanc kot ksenobiotikov (42).

Vsi aerobni organizmi so izpostavljeni oksidativnim procesom, ki so posledica samega aerobnega metabolizma. Intermediati, ki pri tem nastanejo in vključujejo tudi H₂O₂ in

superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), vodijo v nadaljnjo tvorbo toksičnih kisikovih radikalov, ki ovirajo ključne metabolne procese ter lahko vodijo v poškodbe celice (43). Poleg tega lahko hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) odvzame vodikov atom molekuli lipida v biološki membrani. Pri tem nastane lipidni radikal, ki reagira z v membrani raztopljenim tripletnim kisikom (3O_2) do peroksilnega radikala ($R-O-O^{\cdot}$), ki lahko odvzame vodikov atom naslednji molekuli lipida. Potekati začne verižna radikalska reakcija, ki se nadaljuje v nekontroliran ter kompleksen sistem oksidacij lipidnih komponent, ki ga imenujemo lipidna peroksidacija. Ta pripelje do spremenjene strukture in funkcije biološke membrane (44).

Glutation je eden najpomembnejših vzvodov antioksidativne obrambe z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS – "*reactive oxygen species*") povzročene oksidativnega stresa, pri čemer glutacion v reakciji ROS reducira, sam pa se oksidira. Reducirajočo funkcijo glutaciona obnovi encimsko katalizirana reakcija v prisotnosti NADPH (43). Na **sliki 2** so



natančneje predstavljene temeljne homeostazne poti glutaciona v sesalskih celicah.

Slika 2: Osnovne reakcijske poti glutaciona. Razlaga kratic: Cys – cistein, Glu – glutaminska kislina, Gly – glicin, GSH – glutation, GSSG – glutation disulfid, GSR – glutationski konjugati, GST – glutation transferaza, GPX – glutation peroksidaza, MRP – multidrug resistance- associated protein (človeški

prenašalni protein, povezan z odpornostjo proti več učinkovinam), OATP – organic anion transporting protein (organski anionski prenašalni protein), TRX – tioredoksin (43).

ROS pa ne nastajajo samo fiziološko pri procesu aerobnega metabolizma, temveč tudi pri vplivu zunanjih dejavnikov, kot so različne oblike sevanja, ksenobiotiki ter kovine (45), med katere spada tudi živo srebro, na katero se v diplomski nalogi osredotočamo. Tako glutation ne le veže živo srebro s pomočjo sulfhidrilne funkcionalne skupine, ampak tudi zmanjšuje škodo z živim srebrom povzročene oksidativnega stresa.

1.3.2 Glutation S-transferaza

Glutation S-transferaze (GST) so skupina encimov, ki imajo pomembno vlogo pri reakcijah druge faze biotransformacije. V sesalskih celicah jih najdemo v glavnem v citosolu, določene razrede pa so zasledili tudi v mitohondriju in mikrosomih. Njihova najbolj izstopajoča naloga je kataliza reakcije konjugacije elektrofilov na glutation, med katere spadajo tako endogeni produkti oksidacijskega stresa kot ksenobiotiki (46). GST omogočajo glutationu konjugacijo elektrofilov s povečanjem njegove nukleofilnosti, saj odtegnejo proton sulfhidrilni funkcionalni skupini glutaciona (47).

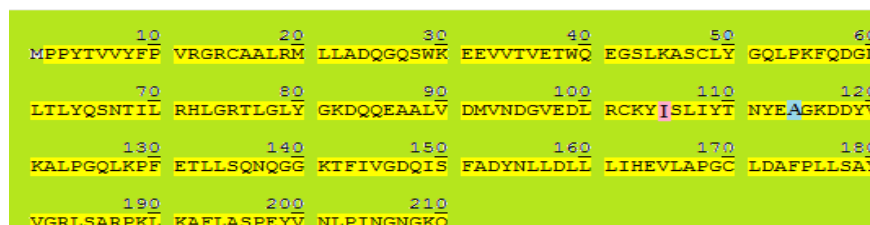
GST pa imajo tudi druge pomembne naloge: vežejo lahko različne endogene in eksogene ligande, izkazujejo izomerazno in peroksidazno aktivnost, imajo pa tudi sposobnost inhibicije c-Jun N-terminalnih kinaz, s čimer lahko v določenih primerih celico zaščitijo pred s H_2O_2 inducirano celično smrtjo. Poznamo 8 različnih razredov, od katerih so najbolj raziskani v citosolu nahajajoči se razredi alfa (α), mi (μ), pi (π) in theta (θ). Razredi se med seboj razlikujejo glede na kriterije, kot so substratna/inhibitorska specifičnost, podobnost primarnih ter terciarnih oziroma kvartarnih struktur ter imunološka istovetnost (46).

1.3.2.1 Glutation S-transferaza pi

Za razliko od ostalih citosolnih GST, pi razred v osnovi vsebuje samo en protein, in sicer GST P (38). Protein sestavlja 210 aminokislin dolga veriga (**slika 3**).

Temeljna funkcija GSTP je kataliza konjugacije reducirane glutaciona z velikim številom tako endogenih kot eksogenih hidrofobnih elektrofilov. Poleg tega regulira CDK5 aktivnost preko p25/p35 translokacije ter je preko tega udeležen v preprečevanju

nevrodegenerativnih procesov (48) in ima pomembno vlogo pri že omenjeni inhibiciji c-Jun N-terminalnih kinaz (49).



Slika 3: Aminokislinsko zaporedje proteina GSTP. Z rožnato barvo je označeno mesto spremembe (105) aminokislina iz izolevcina v valin pri SNP *Ile105Val*. Z modro barvo je označeno mesto spremembe (114) aminokislina iz alanina v valin pri SNP *Ala114Val* (48).

Geni, ki kodirajo GSTP encim, se nahajajo na 11. kromosomu, in sicer na lokusu q13 (49). Na obravnavanem genu *GSTP1* je poznanih le malo polimorfizmov. V diplomski nalogi bomo proučevali vpliv dveh najpogostejših polimorfizmov; *Ile105Val* (*rs1695*) in *Ala114Val* (*rs1138272*). Pri obeh gre za zamenjavo zgolj enega nukleotida, torej za SNP ("single nucleotide polymorphism").

Pri SNP *Ile105Val* gre za drugačnosmiselno (t.i. "missense") mutacijo, kjer sprememba enega nukleotida, v tem primeru gre za zamenjavo adenina (A) z gvaninom (G), povzroči spremembo kodona, ki vodi v zamenjavo v aminokislino. Pri SNP *Ile105Val* na mestu 105 pride do zamenjave izolevcina v valin (50).

Podobno je pri SNP *Ala114Val*, kjer zamenjava nukleotida iz citozina (C) v timin (T) vodi v spremembo kodona, ki zamenja aminokislino na mestu 114 iz alanina v valin (51). Mesta zamenjav proučevanih SNP si lahko ogledamo na **sliki 3**.

Obe aminokislinski spremembi se nahajata v aktivnem mestu peptida GSTP ter povzročita značilne spremembe medatomskih razdalj aminokislin, ki so ključne za učinkovito vezavo elektrofila. Tako so v nedavni študiji ugotovili, da je homozigot za polimorfizem *Ala114Val* izkazal 80% prvotne encimske aktivnosti, medtem je pri homozigotu za polimorfizem *Ile105Val* aktivnost padla na 55%.

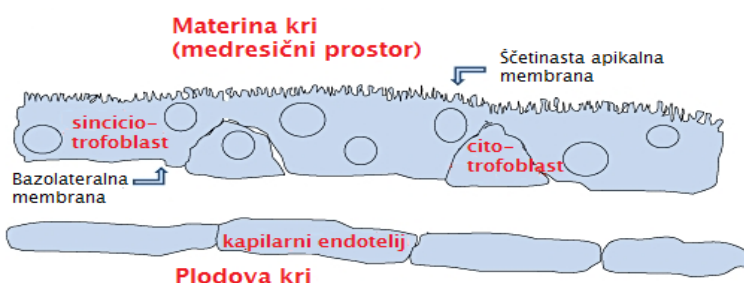
Pojav polimorfnih *Ile105Val* in *Ala114Val* vodi tudi v dokazljive klinične učinke. Na splošnem sta obravnavana SNP-a pogosto proučevana v povezavi s spremembami tveganja

za rakave bolezni ter kliničnimi odzivi na zdravljenje s protitumornimi učinkovinami. Celotno lahko najdemo spisek več kot 400 publikacij, ki navajajo povezave med genetskimi variacijami *GSTP1* ter več kot 200 boleznimi (52), kot sta diabetes tipa II (53) in astma pri otrocih (54).

1.4 Prehajanje živosrebrovih spojin preko placente

Placenta je organ, ki omogoča izmenjavo hranilnih snovi, plinov ter odpadnih snovi med materjo in plodom. V posteljico se z ene strani razvejujejo maternične vene, z druge strani pa popkovni arteriji. Prostor, ki ločuje nosečnico ter plodovo kri, imenujemo medresični prostor. Izmenjava snovi poteka preko horionskih resic, ki so sestavljene iz treh plasti; plodovega trofoblasta, plasti opornega tkiva ter kapilarnega endotelija plodu.

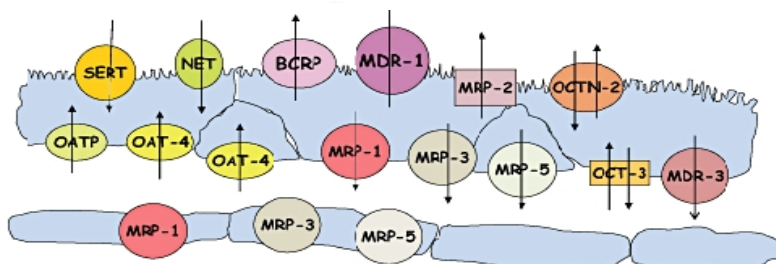
Slika 4: Medresični prostor in horionske resice (55).



Slika 5: Najpogostejši prenašalci placente.

Razlaga kratic: *BRCP* – breast cancer resistance protein (protein, izoliran pri odpornih vrstah raka dojke), *MDR* – multidrug resistance protein, *MRP* –

multidrug resistance-associated protein (človeški prenašalni protein, povezan z odpornostjo proti več učinkovinam), *NET* – noradrenalinski transporter, *OAT* – organski anionski transporter, *OATP* – organski anionski polipeptidni transporter, *OCT* – organski kationski transporter, *SER* – serotoninški transporter (55).



Placento z lahkoto prehajajo majhne, lipidotopne zvrsti, vodotopne snovi prehajajo težje, zlasti tiste z večjimi molekulami. Prehod esencialnih ioniziranih zvrsti ter organskih molekul je omogočen preko prenašalnih molekul (55).

V skladu z zgornjimi ugotovitvami, lahko živosrebrovi hlapi placento nemoteno prehajajo. Sposobnost prehoda raste s starostjo placente, ko se prepustnost membran poveča, njihova debelina pa zmanjša. Najvišje koncentracije živega srebra so našli v plodovih jetrih, ki so

bogata z metalotioneini, ki vežejo večino živega srebra anorganskega izvora v prenatalnem obdobju. Po rojstvu se koncentracija metalotioneinov v jetrih otroka zmanjšuje, zaradi česar so opazili povečane koncentracije živega srebra v ledvicah ter CŽS novorojenca. Pri dovolj visokih koncentracijah Hg^{2+} , sledi postopen razvoj kliničnih znakov, opisanih v prejšnjih poglavjih.

Ionizirane živosrebrove zvrsti placento slabo prehajajo (56).

Znano je, da MeHg placento prehaja brez težav, vendar natančen mehanizem prehoda zaenkrat še ni poznan. Med najbolj zastopanimi teorijami je tvorba konjugata med MeHg in cisteinom, ki posnema aminokislino metionin. Tako vezan MeHg lahko placento prehaja preko njenih aminokislinskih prenašalcev. Zgoraj opisan način prehoda MeHg so pokazale tudi nekatere epidemiološke študije (57).

2 NAMEN DELA

Živo srebro v vseh oksidacijskih stanjih neposredno zmanjšuje koncentracijo endogenih molekul s prostimi sulfhidrilnimi skupinami, ki imajo antioksidantno delovanje. Poleg tega živo srebro posredno tvori ROS, ki delujejo oksidantno in lahko sprožijo lipidno peroksidacijo. Da se preprečijo nadaljnje oksidativne poškodbe v organizmu, so zato razviti posebni antioksidantni sistemi zaščite. Eden izmed najpomembnejših je glutationski sistem, ki vključuje tudi encim glutation S-transferazo pi (GSTP), ki jo kodira gen *GSTP1*. Dokazano je bilo, da polimorfizma Ala114Val in Ile105Val na genu *GSTP1* zmanjšata encimsko aktivnost GSTP. V diplomski nalogi bomo ugotavljali, ali je prisotnost polimorfizmov na genu *GSTP1* in s tem zmanjšana aktivnost encima GSTP pri nosečnicah in novorojencih povezana z višjimi koncentracijami Hg^{2+} ter MeHg v različnih bioloških vzorcih.

Namen diplomskega dela bo ugotoviti prisotnost statistično značilnih povezav med:

- prisotnostjo SNP polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val v genu *GSTP1* pri nosečnicah ter njihovih novorojencih s koncentracijami Hg^{2+} ter MeHg v venski krvi, mleku, laseh in urinu mater ter popkovnični krvi in urinu novorojencev
- prisotnostjo SNP polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val na genu *GSTP1* pri novorojencih ter koncentracijami Hg^{2+} ter MeHg v popkovnični krvi ter urinu novorojencev

Na voljo imamo tudi že določene koncentracije nekaterih esencialnih kovin (Mn, Zn, Se, Cu), nekaterih toksičnih kovin (Cd, Pb, As) v materini ter popkovnični krvi ter PUFA ("*polyunsaturated fatty acids*") v materini krvi, ki jih bomo v statistični obravnavi rezultatov vključili kot kovariate zaradi njihovega vpliva na raven oksidativnega stresa.

Temeljni del eksperimentalnega dela diplomske naloge bo izvedba metode kvantitativna verižna reakcija s polimerazo ("*quantitative polymerase chain reaction*" - *qPCR*) na vzorcih DNK, predhodno izoliranih iz venske krvi mater ter popkovničnega tkiva

novorojencev. Ključna koraka qPCR vključujeta pomnoževanje zelenih odsekov DNK in alelna diskriminacija s pomočjo specifičnih hidrolizirajočih sond.

Raziskovalni del diplomske naloge bomo zaključili s statistično obdelavo podatkov s primernim statističnim programom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovanci in vzorci

Raziskovalci so zbrali biološke vzorce 429 slovenskih novorojencev ter 179 hrvaških novorojencev, kar je skupaj 608 preiskovanih otrok. Prav tako so odvzeli biološke vzorce 211 hrvaških mater, medtem ko vzorci za slovenske matere žal niso bili uspešno zbrani. Podatki in vzorci preiskovancev so del študije projekta PHIME ("*Public Health Impact of long-term, low-level Mixed Element Exposure in susceptible population strata*"), ki pri nosečnicah in novorojencih iz 22 različnih evropskih in drugih držav opredeljuje vpliv dolgotrajne izpostavljenosti toksičnim kovinam v nizkih odmerkih.

Vzorce mater in otrok so analizirali ločeno, sprva v vsaki državi posebej, nato pa je sledila analiza vzorcev vseh otrok hkrati. Hrvaškim materam so na kontrolnih pregledih v ustanovi Klinički bolniški center Rijeka, na oddelku Klinika za ginekologijo i porodništvo v Reki, odvzeli vzorce periferne venske krvi ter las. Ob rojstvu otrok so zbrali tudi vzorce popkovnične krvi ter tkivne vzorce popkovine. Prav tako so zbirali vzorce mleka hrvaških mater ter vzorce urina tako hrvaških mater kot otrok. Ob rojstvu slovenskih otrok so odvzeli vzorce popkovnične krvi ter tkivne vzorce popkovine in pri nekaterih materah so uspeli zbrati vzorce las ter mleka.

Od hrvaških mater so z vprašalniki pridobili tudi pomembne podatke, ki dajejo boljši vpogled v njihovo zdravstveno stanje ter življenjske navade: starost, ITM (indeks telesne mase) med nosečnostjo in porodom, količina zaužitih rib (svežih, zamrznjenih, konzerviranih), količina zaužitih alkoholnih pijač (vino, pivo, žgane pijače) ter kadilski status. Frekvence in povprečne vrednosti naštetih parametrov si lahko ogledamo v **preglednici XX** (7. poglavje: Priloge).

Vse preiskovanke so podale pisno soglasje o vključitvi lastnih ter vzorcev svojih otrok v študijo, ki sta jo odobrili etični komisiji tako na Hrvaškem kot v Sloveniji.

3.2 Določanje koncentracij Hg^{2+} in MeHg

Meritve koncentracij vseh izbranih kovin so bile opravljene na inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Koncentracije Hg^{2+} v venski krvi (MHg), mleku (milkHg), laseh (HHg) in urinu (MuHg) mater ter popkovnični krvi (CbHg) ter urinu (BuHg) novorojencev so določili na Inštitutu Jžef Štefan z metodo atomska absorpcijska spektrometrija (AAS). Ta temelji na meritvi absorpcijskega elektromagnetnega valovanja, ki ga absorbirajo vzbujeni atomi vzorca v plinastem stanju. Vzorce je pred analizo potrebno upariti na primerni temperaturi ter atomizirati s pomočjo plamena. Skozi tako pripravljen vzorec spustijo svetlobo primerne valovne dolžine. Sledi detekcija deleža prepuščene svetlobe po absorpciji skozi vzorec. Meritve koncentracij Hg^{2+} v izbranih bioloških vzorcih so izvedli na aparaturi Direct Mercury Analyzer (Milestone Srl, Italija).

Koncentracije MeHg v venski krvi nosečnic in popkovnični krvi novorojencev so določili z metodo CV-AFS ("*cold vapour atomic fluorescence spectrometry*"), izpeljanko atomske fluorescenčne spektrometrije, ki je najbolj uporabna za analizo sledov lahko hlapnih kovin, kot je živo srebro. Vzorce je pred meritvijo potrebno ekstrahirati, etilirati ter komponente ločiti s plinsko kromatografijo. Za meritve koncentracij MeHg so uporabili aparaturo Brooks Rand Labs, Model I, ZDA.

Koncentracije MeHg v laseh so določili z metodo plinska kromatografija s sklopljenim detektorjem za zajetje elektronov ("*gas chromatography – electron capture detector*" – GC-ECD). Temelji na merjenju prepuščenega toka elektronov. Tok elektronov, ki sestavlja osnovni signal, tvori sevalec beta delcev v kombinaciji z inertnim plinom, kateremu beta delci z lahkoto zbijajo elektrone. Metoda je uporabna za določanje nizkih koncentracij snovi z visoko elektronegativnostjo, ki so sposobne absorpcije elektronov, med katere spadajo tudi organokovinske spojine (58). Aparatura, ki so jo uporabili za analizo vzorcev, je GC-ECD, HP 5890, Hewlett Packard, ZDA.

3.3 Določanje koncentracije ostalih izbranih kovin in PUFA

Koncentracije arzena, bakra, cinka, kadmija, mangana in svinca so določili na Inštitutu Jožef Štefan z metodo masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo ("*inductively coupled plasma mass spectrometry*" – ICP-MS). Gre za različico klasične masne spektrometrije, katere prednosti so večja hitrost, občutljivost in natančnost. Namenjena je zlasti merjenju izredno nizkih koncentracij kovin in nekaterih nekovin. Na začetku

postopka izvajajo ionizacijo vzorca s pomočjo induktivno sklopljene plazme – gre za inertni plin, ki ga ioniziramo s pomočjo segrevanja z električno tuljavo, ki po postopku vsebuje dovolj visoke koncentracije ionov in elektronov, da postane električno prevoden. Nadalje poteka ločba ionov na podlagi razmerja med maso in nabojem ter kvantifikacija ionov na detektorju na podlagi signala, ki je sorazmeren s koncentracijo iona (59). Za izvedbo postopka so uporabljali aparaturo Octapole Reaction System (ORS) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, 7500 ce, Agilent Technologies, ZDA.

Za meritve koncentracij selena so uporabljali metodo hidridna atomska fluorescenčna spektrometrija ("*hydride generation atomic fluorescence spectrometry*" – HG-AFS). Pred izvedbo postopka na aparaturi je potrebna mineralizacija vzorca s segrevanjem in dodatkom $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$. Sledi nastanek hlapnega selenovega hidrida, ki po prehodu skozi vodikov plamen razpade. Atomi selena po razpadu sevajo fluorescenčno svetlobo značilne valovne dolžine, ki jo zazna detektor aparature, nastali signal je sorazmeren koncentraciji selena v vzorcu.

Koncentracije PUFA so določili s pomočjo transesterifikacije *in situ*, kateri je sledila detekcija s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem ("*gas chromatography – flame ionization detector*" – GC-FID), ki spada med učinkovitejše metode za merjenje koncentracij organskih spojin, saj vsebujejo visoke koncentracije ogljika. Metoda temelji na reakciji pirolize s pomočjo plamena, ki vodi do nastanka pozitivno nabitih ionov ter elektronov, ki povzročijo nastanek električnega toka med elektrodama. Izmerjen električni tok je sorazmeren s količino reduciranih ogljikovih atomov v plamenu (60).

3.4. Izolacija DNK

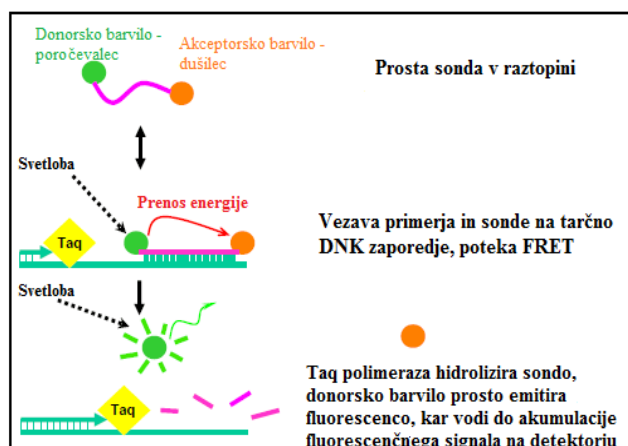
Genomsko DNK novorojencev iz popkovničnega tkiva, odvzetega ob rojstvu, so izolirali na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani. Uporabili so reagente iz kompleta QIAamp DNA Mini Kit, ki ga proizvaja QIAGEN iz ZDA. Izolacijo so izvedli po protokolu DNA *purification from tissues* iz priročnika *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 04/2010* (61). Uspešnost izolacije so preverili z meritvami s spektrofotometrom NanoDrop (ND1000, ZDA) pri 260 nm, čistost izolirane DNK pa z razmerjem absorbanc pri valovni dolžini 260 in 280 nm, določenem na isti aparaturi.

Genomska DNK nosečnic je bila izolirana iz levkocitov periferne venske krvi s pomočjo reagentov iz kompleta *High Pure PCR Template Preparation Kit*, Roche, Švica. Materino DNK so v naslednjem koraku redčili z ultra čisto vodo v razmerju 1:20, DNK novorojenčkov iz popkovničnega tkiva pa zaradi nižjih koncentracij ni bilo potrebno redčiti. Vzorce so hranili na temperaturi -20°C do izvedbe nadaljnjih analitskih postopkov.

3.5. Alelna diskriminacija z uporabo specifičnih hidrolizirajočih sond

Za določanje prisotnosti izbranih polimorfizmov na genu *GSTP1* smo uporabili metodo qPCR, ki je nadgradnja klasične PCR ter se odlikuje z višjo hitrostjo, občutljivostjo, zmogljivostjo in ponovljivostjo. PCR je metoda, pri kateri termostabilni encim DNK-polimeraza v ciklih pomnožuje krajši izbrani del matrične DNK, ki ga določa izbira začetnih oligonukleotidov. V vsakem ciklu se število odsekov DNK podvoji. Temeljni princip qPCR ostaja enak, s tem da pomnoženo DNK fluorescenčno označijo, skozi cikle nastala fluorescenca pa je sorazmerna količini pomnožene DNK, kar lahko spremljamo tekom celotnega procesa qPCR. Pomnoževanje in detekcija torej potekata sočasno. Pri izvedbi qPCR se lahko uporabljajo različni načini fluorescenčnega označevanja, pri čemer smo v eksperimentalnem delu diplomske naloge uporabljali označevanje s specifičnimi hidroliznimi sondami, natančneje s sondami TaqMan[®]. Princip označevanja in detekcije temelji na mehanizmu FRET ("*fluorescence resonance energy transfer*") ter 5' eksonukleazni aktivnosti polimeraze (**slika 6**). Hidrolizna sonda se v skladu s parjenjem baz veže na specifično zaporedje DNK, ki je znotraj položaja oligonukleotidnih začetnikov. Sonda ima na enem koncu vezan poročevalec, na drugem pa dušilec. Pri nehidrolizirani sondi sta poročevalec in dušilec dovolj skupaj, da se fluorescenca iz poročevalca prenaša na dušilec, zato detektor aparature fluorescence ne zazna – pride do FRET. Med podaljševanjem DNK verige DNK polimeraza s svojo 5'-eksonukleazno aktivnostjo cepi sondo, pri čemer gresta molekuli poročevalca in dušilca narazen, zato lahko aparatura emitirano fluorescenco poročevalca nemoteno detektira.

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili dva različno obarvana poročevalca: modrega FAM[®] ter zelenega VIC[®]. Vsak se veže na eno izmed alelnih različic, zato metodi pravimo alelna diskriminacija. Ta je temelj genotipizacije vzorcev.



Slika 6: Grafični prikaz principa vezave sonde na specifično zaporedje DNK ter njenega delovanja (62).

3.5.1 Reagenti

- ultra čista voda – dH₂O
- 5x reakcijski pufer; uporabili smo petkratni koncentrat reakcijskega pufera HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus (ROX), Solis BioDyne, Estonija; predpripravljen reakcijski pufer za qPCR reakcijo z naslednjimi komponentami: HOT FIREPol[®] DNK polimeraza, pufer primerne sestave s 15 nM koncentracijo MgCl₂ (Mg²⁺ služi kot kofaktor DNK polimeraze, poleg tega stabilizira nastalo dvojno vijačnico), dNTP ter ROX barvilo, ki je interno referenčno barvilo, ki pomaga normalizirati fluorescenčni signal, ki ga oddaja poročevalec pri qPCR reakciji
- genomska DNK
- oligonukleotidna začetnika in sonda Ala114Val; za identifikacijo SNPa Ala114Val smo uporabili sondo TaqMan[®] (SNP Genotyping Assay; C___1049615_20; Applied Biosystems, ZDA)
- Oligonukleotidna začetnika in sonda Ile115Val; za identifikacijo SNPa Ile105Val smo uporabili sondo TaqMan[®] (SNP Genotyping Assay; C___3237198_20; Applied Biosystems, ZDA)

Osnovne smernice o sestavi reakcijske zmesi smo dobili iz protokola 5x HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) mešanice (63), končne volumne pa določili upoštevajoč uspešnost qPCR reakcije.

Sestavo reakcijske zmesi za identifikacijo SNPa Ala114Val si lahko ogledamo v **preglednici I**, za identifikacijo SNPa Ile105Val pa v **preglednici II**. Sestavi reakcijskih

zmesi se razlikujeta, saj nam je za identifikacijo SNPa Ile105Val začelo zmanjkovati izbrane sonde, zato smo reakcijo izpeljali z manjšim volumnom sonde in s tem tudi ostalih reagentov. Tako pomnoževanje kot detekcija sta uspela, zato smo eksperimentalno delo nadaljevali z manjšimi volumni reagentov.

Preglednica I: Sestava reakcijske zmesi za identifikacijo SNPa Ala114Val.

Reagent	Volumen [μ l]
5x reakcijski pufer	2
Začetnika in sonda Ala114Val	0,5
Ultra čista voda dH ₂ O	6,5
Genomska DNK	1
Skupni volumen reakcijske zmesi	10

} **9 μ l**

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za identifikacijo SNPa Ile105Val.

Reagent	Volumen [μ l]
5x reakcijski pufer	1
Začetnika in sonda Ile115Val	0,25
Ultra čista voda dH ₂ O	3,25
Genomska DNK	1
Skupni volumen reakcijske zmesi	5

} **4 μ l**

3.5.2 Pripomočki in naprave

- laboratorijske rokavice brez smukca, velikost S, Kimberly Clark, ZDA
- plastična posoda za rošenje z 10% etanolom za čiščenje pribora, ki ga avtoklaviramo
- plastične škatlice, v katerih avtoklaviramo nastavke za pipetiranje, Sarstedt, Nemčija

- stekleni vsebniki, v katerih avtoklaviramo plastične epruvete s pokrovčkom
- nastavki za pipetiranje epT.I.P.S.[®]; brezbarvni nastavki za volumne do 10 µl, rumeni nastavki za volumne do 300 µl ter modri nastavki za volumne do 1000 µl, Eppendorf, Nemčija
- plastične epruvete s pokrovčkom (1 ml in 1,5 ml) Eppendorf Safe-Lock Tubes[®], Eppendorf, Nemčija
- avtoklav Steriltechnik AG, Nemčija
- plastična posoda za rošenje s 3% natrijevim hipokloritom (NaOCl)
- pipete Eppendorf Research[®] različnih velikosti (0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl), Eppendorf, Nemčija
- vorteks mešalec Combi-Spin, FVL-2400N, Biosan, Latvija
- plastični podstavki za mikrotitrne ploščice, plastične epruvete ter DNK vzorce
- delovna komora z možnostjo sterilizacije z UV svetlobo, Biosan DNA/RNA UV Cleaner, UVT-S-AR, Biosan, Latvija
- mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami (16x24), LightCycler[®] 480 Multiwell plate 384, white, Roche, Švica
- prozorna samolepilna folija LightCycler[®] 480 Sealing Foil, Roche, Švica
- centrifuga Centric 322A, Tehtnica[®], Slovenija
- qPCR aparatura: LightCycler[®] 480 II Real-Time PCR System, Roche, Švica
- računalniški program LightCycler[®] Software release 1.5.0 SP4, Version 1.5.0.39, Roche, Švica

3.5.3 Priprava vzorcev in potek qPCR reakcije

Genotipizirali smo skupno 608 vzorcev slovenskih ter hrvaških otrok, vzorce hrvaških mater pa so predhodno že genotipizirali za oba izbrana SNPa.

Pred samo qPCR reakcijo moramo biti zelo pazljivi in natančni pri pripravi vzorcev, saj je od tega v veliki meri odvisna uspešnost pomnoževanja ter detekcije. Najpomembnejše je preprečevanje kontaminacije vzorcev s tujo (najpogosteje lastno) DNK, ki povzroči nespecifično pomnoževanje, nastala zmes PCR produktov pa je neprimerna za genotipizacijo. Zato smo skozi celoten postopek priprave vzorcev oblečeni v laboratorijsko haljo ter laboratorijsko obutev primerne čistoče, daljši lasje so speti, na rokah nosimo laboratorijske rokavice brez smukca, v katerih se izogibamo dotikanja izpostavljenih delov kože ter las. Pred začetkom rokovanja z reagenti ter vzorci DNK, moramo avtoklavirati nastavke za pipete ter plastične epruvete v za to namenjenih vsebnikih, ki jih pred avtoklaviranjem očistimo z alkoholom. Samo eksperimentalno delo poteka v prostoru, kjer je gibanje omejeno, natančneje v komori z možnostjo sterilizacije z UV svetlobo. Avtoklavirani material, pipete, plastične podstavke, vorteks mešalec ter delovno površino UV komore očistimo s 3% raztopino NaOCl. Vse našete pripomočke v komori nato osvetljujemo s pomočjo UV žarnice še 20 minut. Nekaj minut pred koncem osvetljevanja pripomočkov z UV svetlobo v delovni komori, prenesemo iz zamrzovalnika ultra čisto vodo, Mix Plus mešanico, vzorce DNK ter sondo na primerno mesto, zaščiten pred svetlobo, kjer se lahko odtalijo. Pred vnosom v delovno komoro zunanjo stran vsebnika vsakega reagenta očistimo s 3% raztopino NaOCl.

Pred začetkom dela v komori preračunamo količino reagentov, ki jih bomo pri pripravi reakcijske zmesi potrebovali. Delo si olajšamo s pripravo skupnega volumna reagentov za želeno število analiziranih vzorcev, DNK vzorce pa dodajamo naknadno na mikrotitrsko ploščico. Pri tem za vsakih 10 predvidenih vzorcev dodamo še prebitok reagentov za en vzorec zaradi izgube med pripravo in prenosom reakcijske zmesi na mikrotitrsko ploščico. Reagente dodajamo glede na padajoči volumen. Mix Plus mešanico ter raztopino s sondo pred dodatkom vorteksiramo, prav tako dobro zvorteksiramo skupno mešanico po vsakem dodatku reagenta, na koncu pa mešanico nekaj minut centrifugiramo, da je čim bolj homogena.

Nadalje pripravljeno mešanico reagentov brez DNK nanašamo na mikrotitrsko ploščico – po 9 oziroma po 4 μ l v vsako vdolbinico. Dodamo po 1 μ l DNK vzorca v vse vdolbine z reakcijsko mešanico, s tem da v zadnjo vdolbinico naneseemo 1 μ l dH₂O, ki služi kot slepi vzorec. Če v vdolbinici s slepim vzorcem qPCR reakcija ne poteče, dokažemo, da med pripravo ni prišlo do neželene kontaminacije z DNK ter da je qPCR reakcija primerno

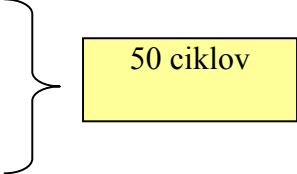
specifična.

Ploščico po nanosu vzorcev prekrijemo s samolepilno folijo ter tako preprečimo mešanje vzorcev ter njihovo kontaminacijo med reakcijo. Ploščico pred vstavitvijo v aparaturo centrifugiramo ter tako zagotovimo primerno homogenost mešanice v vsaki vdolbinici.

Reakcija poteka po predhodno nastavljenem temperaturnem programu, ki sledi priporočilom proizvajalca reakcijske mešanice 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX), vendar smo število ciklov ter trajanje posameznih faz na empirični podlagi prilagodili za doseganje kar najuspešnejšega pomnoževanja, kvantifikacije ter tako genotipizacije.

Preglednica III: *Reakcijski pogoji za obe qPCR reakciji.*

Stopnja posameznega cikla	Temperatura [°C]	Trajanje
Začetna denaturacija	95	15 min
Denaturacija	95	15 s
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov ter podaljševanje verige	60	90 s



Po končani reakciji smo z računalniškim programom *LightCycler® Software 1.5.0.39* ugotavljali uspešnost qPCR reakcije ter genotip za posamezne DNK vzorce.

3.6 Statistična analiza podatkov

Za iskanje morebitnih statistično značilnih povezav med genotipi izbranih polimorfizmov ter koncentracijami živega srebra ter drugih kovin v določenih bioloških vzorcih, smo uporabili statistični program SPSS Statistics® 17.0, IBM Corporation, ZDA. Izvedli smo naslednje parametrične in neparametrične statistične teste:

- normalnost porazdelitve vrednosti odvisnih spremenljivk (koncentracije Hg^{2+} , MeHg, izbranih kovin ter PUFA v bioloških vzorcih) testiramo z neparametričnim **Kolmogorov-Smirnov testom**. Pri $p > 0,05$ se vrednosti odvisne spremenljivke normalno oziroma logaritemsko normalno porazdeljujejo, pri $p < 0,05$ se vrednosti odvisne spremenljivke ne porazdeljujejo normalno

- signifikantnost povezave med neodvisno spremenljivko (genotip) ter odvisno spremenljivko, ki se ne porazdeljuje normalno, ocenimo s **Kruskal-Wallisovim neparametričnim testom**. Vrednosti $p < 0,05$ kažejo na statistično značilno povezavo, vrednosti $p > 0,05$ pa na statistično neznačilno povezavo med spremenljivkama
- signifikantnost povezave med neodvisno spremenljivko ter odvisno spremenljivko, ki se normalno oziroma logaritemsko normalno porazdeljuje, ocenimo s parametričnim **ANOVA testom**. Vrednosti $p < 0,05$ kažejo na statistično značilno povezavo, vrednosti $p > 0,05$ pa na statistično neznačilno povezavo med spremenljivkama
- signifikantnost povezave med neodvisno spremenljivko ter odvisno spremenljivko, ki se normalno oziroma logaritemsko normalno porazdeljuje, bomo ocenili tudi s parametričnim **ANCOVA testom**. Le ta ocenjuje tudi vpliv kovariat na vrednosti odvisne spremenljivke. Pri vsaki odvisni spremenljivki bomo ocenili vpliv naslednjih kovariat: c(Mn), c(Se) in c(Zn) v primernih bioloških tkivih. Po ANOVA analizah, ki kažejo na signifikantnost neke povezave med odvisno ter neodvisno spremenljivko, izvedemo ANCOVA analizo, ki vključuje vpliv tudi tistih kovariat, pri katerih vrednosti **Pearsonovega** (spremenljivke, katerih vrednosti se porazdeljujejo normalno) oziroma **Spearmanovega koeficienta** (spremenljivke, katerih vrednosti se ne porazdeljujejo normalno), kažejo na korelacijo z odvisno spremenljivko. Pri ANCOVA testiranju vrednosti $p < 0,05$ kažejo na statistično značilno povezavo med neodvisno in odvisno spremenljivko kljub upoštevanju vpliva kovariat, vrednosti $p > 0,05$ pa na statistično neznačilno povezavo med odvisno in neodvisno spremenljivko kljub upoštevanju vpliva kovariat

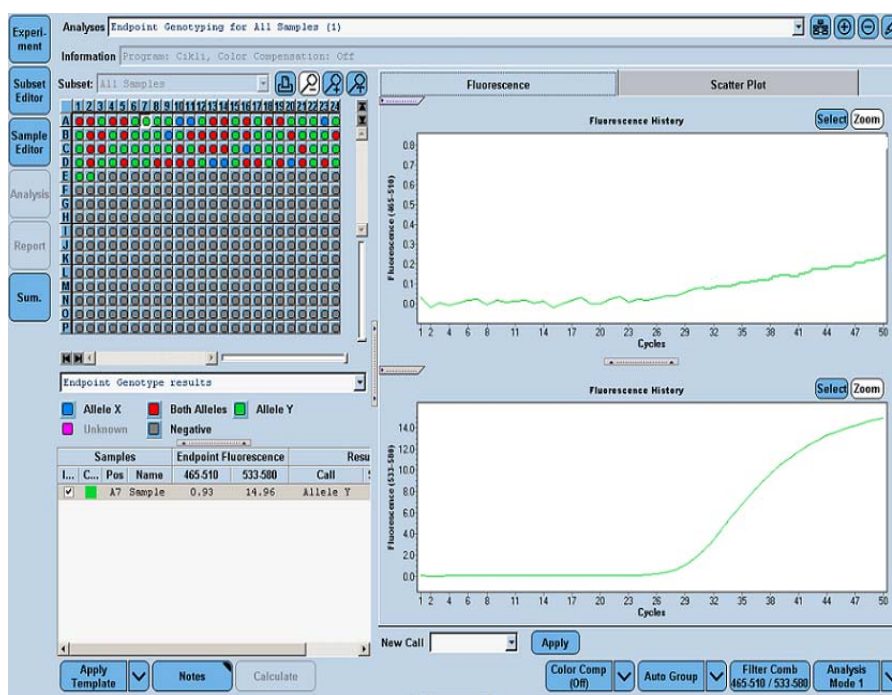
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Določanje genotipov za izbrana polimorfizma

Vse vzorce DNK smo analizirali in določili genotipa na mestu, ki kodirata 105. in 114. aminokislino proteinske molekule GSTP. Genotipizacijo smo izvedli z metodo kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) s pomočjo specifičnih hidrolizirajočih sond.

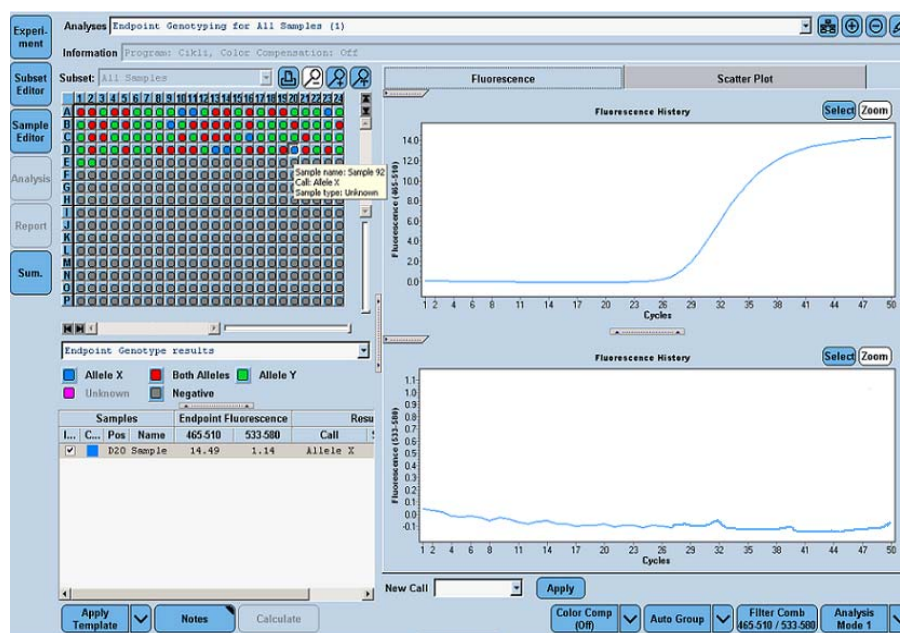
Ob pomnoževanju določenih DNK odsekov pri metodi qPCR, se viša tudi količina emitirane fluorescenčne svetlobe, ki jo oddajata izbrani poročevalski barvili VIC[®] oziroma FAM[®]. Glede na vrsto barvnega odziva smo določili, katera alela sta prisotna v posameznem vzorcu in s tem tudi genotip vzorca. Tako je pri alelu 1 prišlo do emisije zelenega VIC[®] barvila (zeleno krivulja - **slika 7**), pri alelu 2 pa je emitiralo modro barvilo FAM[®] (modra krivulja – **slika 8**). Heterozigotne osebe imajo prisotna oba alela in sta emitirali svetlobo obe barvili, na grafu pa je sevanje svetlobe prikazano z rdečo krivuljo (**slika 9**).

Slika 7 prikazuje rezultat homozigota za alel 1, kar pomeni prisotnost genotipa CC pri polimorfizmu Ala114Val oziroma genotipa AA pri polimorfizmu Ile105Val.



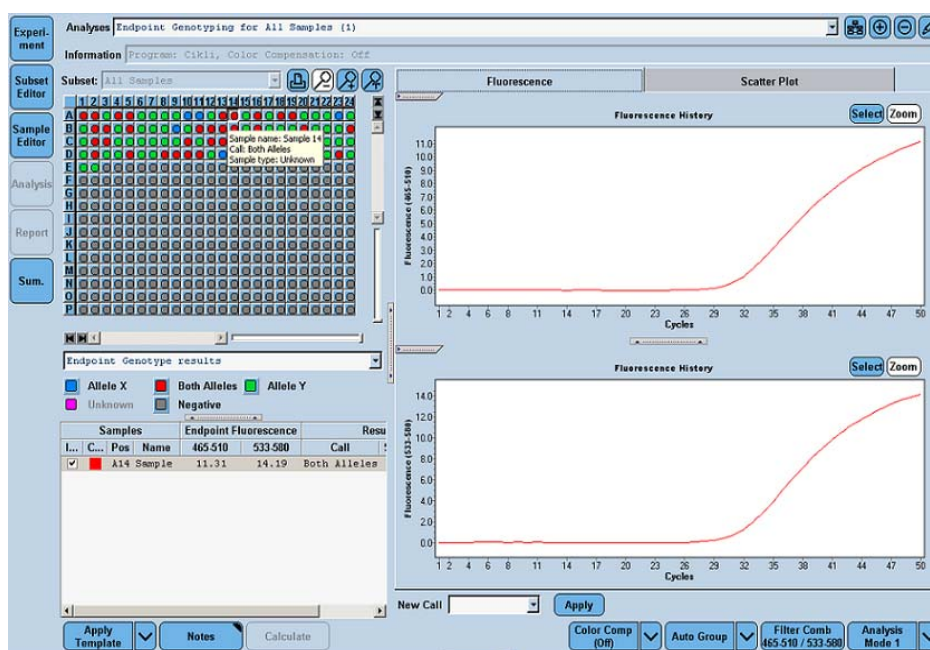
Slika 7: Fluorescenčni krivulji po zaključeni qPCR reakciji. Odziv daje samo barvilo VIC[®], ki oddaja zeleno fluorescenčno svetlobo med valovnimi dolžinama 535 in 580 nm.

Slika 8 prikazuje rezultat homozigota za alel 2, kar pomeni prisotnost genotipa TT pri polimorfizmu Ala114Val oziroma genotipa GG pri polimorfizmu Ile105Val.



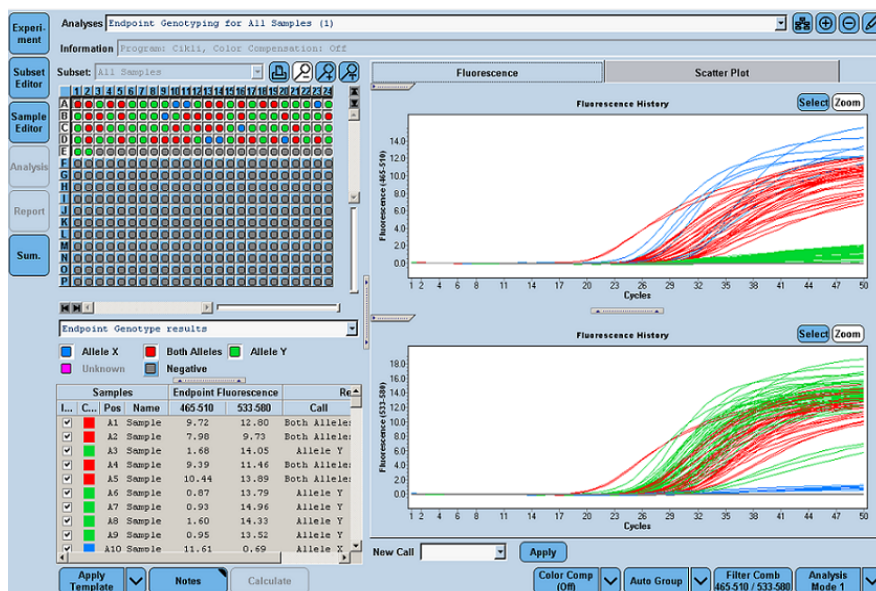
Slika 8: Fluorescenčni krivulji po zaključeni qPCR reakciji. Odziv daje samo barvilo FAM[®], ki oddaja modro fluorescenčno svetlobo med valovnima dolžinama 465 in 510 nm.

Slika 9 prikazuje rezultat heterozigota, kar pomeni prisotnost genotipa CT pri polimorfizmu Ala114Val oziroma genotipa AG pri polimorfizmu Ile105Val.

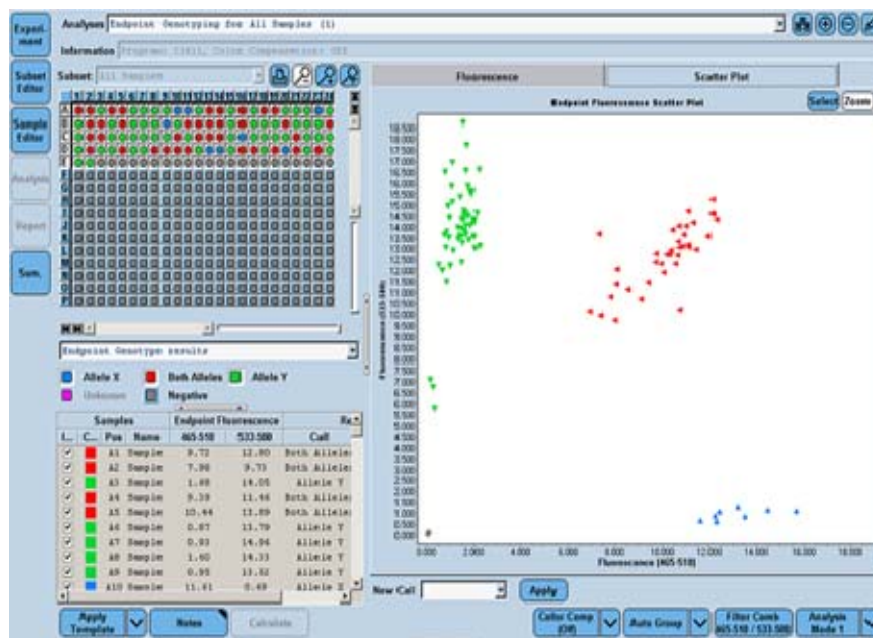


Slika 9: Fluorescenčni krivulji po zaključeni qPCR reakciji. Odziv dajeta obe izbrani poročevalski barvili.

Sliki 10 in 11 prikazujeta rezultat analize 98 vzorcev. Mreža v zgornjem levem kotu slike ponazarja vzorce razporejene na mikrotitrski ploščici. Zeleno obarvanje pomeni vzorec, ki je homozigot za alel 1, modro obarvanje predstavlja homozigota za alel 2, rdeče obarvanje pa heterozigota v posamezni vdolbinici. Sivo obarvanje pomeni odsotnost fluorescence, kar ustreza mestom na ploščici, kamor smo nanesti slepi vzorec.



Slika 10: Prikaz fluorescenčnih krivulj 98 vzorcev po zaključenih qPCR reakcijah.



Slika 11: Razsevni graf 98 vzorcev po zaključenih qPCR reakcijah.

V preglednici XXI si lahko za oba izbrana polimorfizma ogledamo rezultate

genotipizacije posameznih vzorcev celotne proučevane populacije. Frekvence posameznih genotipov za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val smo predstavili v **preglednici XXII**. Preglednici najdemo v 7. poglavju diplomske naloge – Priloge.

4.2 Testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja v naši populaciji za oba polimorfizma

Pridobljene frekvence genotipov za posamezni polimorfizem za združeno populacijo hrvaških in slovenskih otrok smo vstavili v Hardy-Weinbergovo enačbo, da bi preverili ali je naša populacija v t.i. Hardy-Weinbergovem ravnovesju. V taki populaciji so ob naključnem prerazporejanju alelov v populaciji z naključnim "parjenjem" osebkov, razmerja med frekvenco alelov ter genotipov v populaciji konstantna oziroma sledijo Hardy-Weinbergovem načelu. Pri tem veljajo naslednje predpostavke: v populaciji ne prihaja do mutacij, populacija je zaprta (ni emigracij ali imigracij), naravna selekcija ne vpliva različno na nosilce različnih alelov in populacija je neskončno velika.

Hardy-Weinbergovo načelo matematično predstavimo z naslednjo enačbo: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, pri čemer člen p^2 predstavlja frekvenco genotipa MM, $2pq$ frekvenco genotipa Mm, q^2 pa frekvenco genotipa mm (64).

S podatki o frekvencah genotipov v naši proučevani skupini smo s pomočjo programa Course Lab 2.7 določili teoretično pričakovane frekvence genotipov za posamezni polimorfizem. S statističnim χ^2 testom smo ugotavljali, če je razlika med pričakovanimi in določenimi frekvencah genotipov statistično signifikantna. Rezultate smo predstavili v **preglednici IV** ter v **preglednici V**.

Preglednica IV: Testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja v naši populaciji za polimorfizem Ala114Val.

Genotip	Pričakovana frekvenca	Določena frekvenca
CC – nemutirani homozigoti	500,25	497
CT - heterozigoti	102,5	109
TT - mutirani homozigoti	5,25	2
Rezultati izračunov		
p = 0,91	q = 0,09	$\chi^2 = 2,45$
		P = 0,29

Preglednica V: Testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja v naši populaciji za polimorfizem Ile105Val.

Genotip	Pričakovana frekvenca	Določena frekvenca
AA – nemutirani homozigoti	284,63	284
AG - heterozigoti	262,74	264
GG - mutirani homozigoti	60,63	60
Rezultati izračunov		
$p = 0,68$	$q = 0,32$	$\chi^2 = 0,01$
		$P = 0,99$

Pri testiranju obeh izbranih polimorfizmov smo za analizirano populacijo dobili vrednost P, ki je večja od 0,05. To pomeni, da med teoretičnimi (izračunanimi) frekvenca in frekvenca genotipov v naši populaciji ni statistično signifikantne razlike, kar kaže da je naša populacija hrvaških in slovenskih otrok v Hardy-Weinbergovem ravnovesju za oba proučevana polimorfizma.

4.3. Ugotavljanje in primerjava genotipskih frekvenc za oba polimorfizma v naših in drugih populacijah po svetu

Če frekvence genotipov za izbrana polimorfizma pri analizirani populaciji otrok izrazimo v odstotkih, jih lahko primerjamo z zastopanostjo genotipov pri drugih populacijah in etničnih skupinah po svetu. Želeli smo ugotoviti, ali so frekvence genotipov v naši populaciji primerljive s frekvenca v drugih državah po svetu, za katere smo podatke našli v literaturi. Primerjavo smo predstavili v **preglednici VI**, ki primerja delež posameznega genotipa v odstotkih za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val med populacijami glede na geografski izvor; slovensko in hrvaško populacijo proučujemo v diplomski nalogi, ostale populacije pa so že proučene (65,66).

Preglednica VI: Genotipske frekvence za oba polimorfizma v naših in drugih populacijah po svetu.

Proučevana populacija in njen geografski izvor	Polimorfizem					
	Ala114Val			Ile105Val		
	Genotip					
	CC	CT	TT	AA	AG	GG
Slovenija (n = 429)	81,8	17,4	0,2	45,9	44,0	10,0

Hrvaška (n= 390)	84,4	15,4	0,3	49,9	42,5	7,7
Evropa (n = 1130)	83,9	15,2	0,9	44,6	43,8	11,5
Podsaharska Afrika (n= 170)	100	0	0	36,3	48,7	15
ZDA – Afroameričani (n=112)	96,8	3,2	0	33,3	52,4	14,3
Azija (n=90)	100	0	0	66,7	31,1	2,2

Ugotovili smo, da sta slovenska in hrvaška populacija v Hardy-Weinbergovem ravnovesju za oba genotipa ($P_{Ala114Val} = 0,85$, $P_{Ile105Val} = 0,60$), zato smo populaciji združili. Tako dobljeno populacijo smo primerjali z drugimi s pomočjo χ^2 testa. Vrednost P, večja od 0,05 pomeni, da med frekvenca genotipov primerjanih populacij ni statistično značilne razlike. Rezultate si lahko ogledamo v **preglednici VII**.

Preglednica VII: Primerjava vrednosti χ^2 in P med združeno slovensko in hrvaško populacijo ter ostalimi raziskanimi populacijami. Vrednosti P, večje od 0,05, so označene v krepkem tisku.

Populacija in njen geografski izvor	Ala114Val		Ile105Val	
	χ^2	P	χ^2	P
Evropa	2,17	0,34	0,19	0,91
Podsaharska Afrika	22,3	0,0001	5,80	0,055
ZDA - Afroameričani	15,6	0,0004	7,49	0,024
Azija	22,3	0,0001	18,7	0,0001

Vidimo, da razlike v frekvencah genotipov med celotno slovensko in hrvaško populacijo v naši raziskavi in evropsko populacijo pri obeh raziskovanih polimorfizmih niso statistično značilne. Prav tako razlika v frekvencah genotipov pri polimorfizmu Ile105Val med združeno slovensko in hrvaško populacijo Podsaharske Afrike ni statistično značilna.

4.4 Ocena kliničnega pomena polimorfizmov v genu *GSTP1*

4.4.1 Analiza povezanosti polimorfizma Ala114Val pri nosečnicah s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v različnih bioloških vzorcih

Dokazano je, da prisotnost enega ali obeh mutiranih T alelov polimorfizma Ala114Val povzroči zmanjšano aktivnost encima GSTP (52). To lahko vodi do zmanjšane konjugacije Hg^{2+} in MeHg na GSH, kar privede do manj učinkovite eliminacije in posledično večjega

kopičenja Hg^{2+} in MeHg v organizmu. Zato smo hoteli ugotoviti, ali različni genotipi za polimorfizem Ala114Val lahko pripeljejo do statistično značilne razlike med koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v izbranih bioloških vzorcih. V analizo smo vključili meritve koncentracij Hg^{2+} in MeHg v bioloških vzorcih, na katere bi lahko imel materin genotip za polimorfizem Ala114Val imel neposreden vpliv; materino vensko kri, materino mleko, materine lase ter materin urin.

Po preverjanju normalnosti porazdelitve vrednosti odvisnih spremenljivk (koncentracij Hg^{2+} in MeHg v bioloških vzorcih), smo povezanost neodvisne spremenljivke (genotip za polimorfizem Ala114Val) ter (logaritmsko) normalno porazdeljenih odvisnih spremenljivk ocenili z ANOVA testom. Povezanost neodvisne spremenljivke in nenormalno porazdeljenih odvisnih spremenljivk smo ocenili s Kruskal-Wallis testom.

Pri obeh testih veljata enaki ničelna ter alternativna hipoteza:

- ničelna hipoteza: genotip za polimorfizem Ala114Val pri materah ni povezan s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v izbranih bioloških vzorcih. To pomeni, da razlike med povprečnimi vrednostmi koncentracij Hg^{2+} in MeHg med genotipskimi skupinami za polimorfizem Ala114Val niso statistično značilne
- alternativna hipoteza: genotip za polimorfizem Ala114Val je povezan s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v izbranih bioloških vzorcih. To pomeni, da so razlike med povprečnimi vrednostmi koncentracij Hg^{2+} in MeHg med genotipskimi skupinami za polimorfizem Ala114Val statistično značilne

Pri obeh testih je parameter p merilo signifikantnosti; vrednosti $p < 0,05$ dokazujejo statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracij Hg^{2+} in MeHg pri različnih genotipskih podskupinah za polimorfizem Ala114Val. Rezultati ANOVA in Kruskal-Wallis testov so prikazani v **preglednici VIII**.

Tudi, če smo pri ANOVA testih dobili rezultate, ki kažejo na statistično neznačilno povezavo odvisne in neodvisne spremenljivke, smo v vsakem primeru izvedli še ANCOVA testiranje pri normalno porazdeljujočih se spremenljivkah, kjer smo kot kovariate vzeli koncentracije selena, mangana in cinka v pripadajočih tkivih. Našteti elementi namreč ščitijo pred škodljivimi vplivi z živim srebrom povzročene oksidativnega stresa (67,68,

69). Rezultate si lahko ogledamo v **preglednici XXIII** (7. poglavje – Priloge).

Preglednica VIII: Rezultati ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ala114Val pri materah.

Odvisna spremenljivka - biološki vzorec	ANOVA		Kruskal-Wallis	
	p	N	p	N
lnMHg	0,518	209		
MMeHg	0,704	49		
lnmilkHg	0,415	111		
milkMeHg	0,882	25		
lnHHg	0,891	210		
lnHMeHg	0,743	44		
MuHg			0,938	209

Razlaga kratic: ln – logaritem, Hg – Hg²⁺, MeHg – metilživo srebro, M – koncentracija v materini krvi, milk – koncentracija v materinem mleku, H – koncentracija v materinih lasih, Mu – koncentracija v materinem urinu.

Iz preglednice je razvidno, da v nobenem od primerov ne moremo ovreči ničelne hipoteze. Ugotovitev smo primerjali z dosegljivimi literaturnimi podatki ter zasledili študiji, ki povezujeta polimorfizem Ala114Val s koncentracijami Hg²⁺ v venski krvi (70) ter v lasih (71), česar pa v naši raziskavi nismo uspeli potrditi.

Na osnovi teh rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizem Ala114Val ne vpliva na aktivnost GSTP povezano s presnovo Hg²⁺ in MeHg, saj je bila njuna koncentracija v vseh bioloških vzorcih neodvisna od genotipa nosečnice.

4.4.2 Analiza povezanosti polimorfizma Ile105Val pri nosečnicah s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v različnih bioloških tkivih

V dostopni literaturi smo zasledili, da prisotnost polimorfizma Ile105Val povzroči zmanjšano aktivnost encima GSTP (52), kar bi lahko zaradi zmanjšane konjugacije Hg²⁺ in MeHg na GSH privedlo do njihovega kopičenja v organizmu. Zato smo želeli smo opredeliti vpliv polimorfizma Ile105Val na koncentracije v izbranih bioloških vzorcih. V analizo smo vključili meritve koncentracij Hg²⁺ in MeHg v tistih bioloških vzorcih, na katere bi lahko imel materin genotip za polimorfizem Ile105Val neposreden vpliv; materino vensko kri, materino mleko, materine lase ter materin urin. Povezanost genotipa za polimorfizem Ile105Val s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v izbranih bioloških tkivih

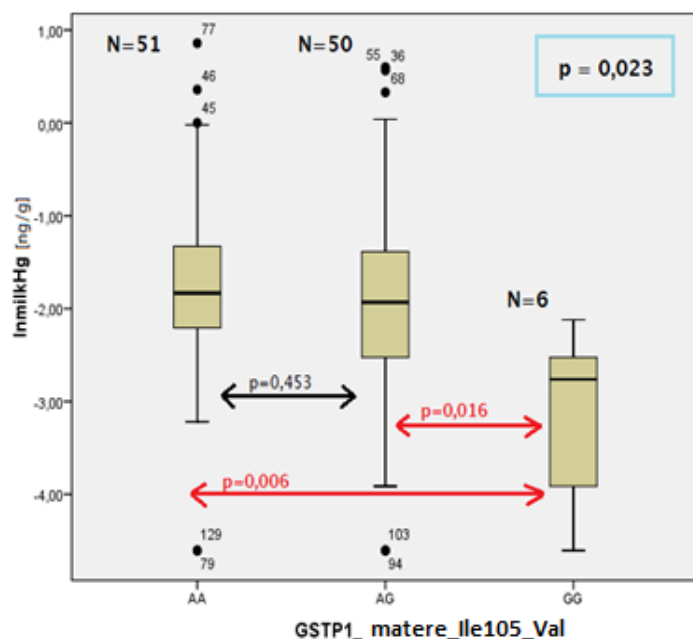
smo ocenili z ANOVA (normalno porazdeljene vrednosti koncentracij) oziroma s Kruskal-Wallis testom (nenormalno porazdeljene vrednosti koncentracij). Rezultate testov si lahko ogledamo v **preglednici IX**.

Preglednica IX: Rezultati ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ile105Val pri materah. Vrednosti p, manjše od 0,05, smo označili s krepkim tiskom.

Odvisna spremenljivka - biološki vzorec	ANOVA		Kruskal-Wallis	
	p	N	p	N
lnMHg	0,595	198		
MMeHg	0,993	47		
lnmilkHg	0,023	107		
milkMeHg	0,550	23		
lnHHg	0,920	199		
lnHMeHg	0,720	42		
MuHg			0,115	198

Razlaga kratic: ln – logaritem, Hg – Hg²⁺, MeHg – metilživo srebro, M – koncentracija v materini krvi, milk – koncentracija v materinem mleku, H – koncentracija v materinih laseh, Mu – koncentracija v materinem urinu.

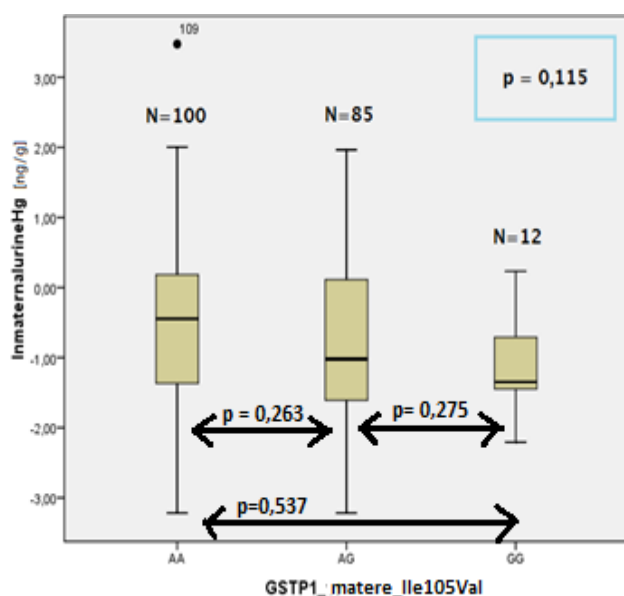
Iz preglednice razberemo statistično značilno povezavo med genotipskimi podskupinami polimorfizma Ile105Val pri materah ter koncentracijo Hg²⁺ v materinem mleku. Izvedli smo še Post Hoc LSD test, ki nam pove, ali se povprečne vrednosti koncentracij Hg²⁺ v materinem mleku med skupinami posameznih genotipov polimorfizma Ile105Val statistično značilno razlikujejo. Rezultate smo grafično ovrednotili na **sliki 12** s t.i. kvartilnim diagramom, s katerim lahko primerjamo povprečne vrednosti ter razpršenost rezultatov odvisne spremenljivke glede na pripadnost skupini neodvisne spremenljivke.



Slika 12: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij milkHg od polimorfizma Ile105Val pri materah.

Iz grafa lahko razberemo, da se koncentracije Hg^{2+} v materinem mleku višajo po naslednjem vrstnem redu genotipov: GG, AG, AA. Najbolj izrazit padec koncentracije Hg^{2+} opazimo pri GG genotipu, kar nam potrdijo tudi Post Hoc LSD testi. To pomeni, da aktivnejšo obliko encima, kot ima mati, več živega srebra se eliminira v mleko. Živo srebro se v mleko eliminira večinoma v Hg^{2+} obliki, manj pa kot MeHg, ki v materino mleko prehaja vezan na albumin. Hg^{2+} se slabo absorbira v GIT, absorpcija je nekoliko višja pri novorojencih. MeHg, prisoten v mleku, se skozi GIT absorbira skoraj popolnoma (72). Tako lahko zaključimo, da genotip, ki zagotavlja bolj aktiven GSTP1 encim, poveča izločanje Hg spojin v mleko, kar zmanjšuje Hg breme pri materi, vendar Hg spojinam izpostavi otroka. Pri tem se je potrebno zavedati, da so koncentracije Hg v materinem mleku nizke ($\bar{X}[\text{mlkHg}] = 0,27 \frac{\text{ng}}{\text{g}}$ za populacijo hrvaških mater) in da je otrok bistveno bolj izpostavljen Hg preko placentnega prenosa ($\bar{X}[\text{CbHg}] = 2,72 \frac{\text{ng}}{\text{g}}$ za združeni populaciji slovenskih ter hrvaških novorojencev).

Čeprav vrednost Kruskal-Wallisovega testa ($p = 0,115$) ne kaže na statistično značilno povezavo med koncentracijami Hg^{2+} v urinu mater in genotipom za polimorfizem Ile105Val, smo povezavo kljub temu grafično ovrednotili (**slika 13**), saj smo želeli spremljati obnašanje koncentracij Hg^{2+} v urinu mater glede na genotip polimorfizma Ile105Val.



Slika 13: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije MuHg od polimorfizma Ile105Val

pri materah.

Iz grafa lahko razberemo, da povprečna koncentracija MuHg pada po naslednjem vrstnem redu genotipov: AA, AG, GG. Vemo, da aktivnost encima GSTP1 narašča v obratnem vrstnem redu. Domnevali smo, da višja aktivnost encima lahko pripelje do učinkovitejše eliminacije Hg²⁺, katerega koncentracije v urinu so tako višje pri genotipih, ki dajo aktivnejši encim GSTP1. Ker rezultati niso statistično značilni, bi za nedvoumne rezultate povečali testirano populacijo, v idealnem primeru bi lahko ovrednotili vpliv različnih kovariat.

4.4.2.1 Testiranje vpliva kovariat pri ugotavljanju povezanosti polimorfizma Ile105Val ter koncentracij Hg²⁺ v materinem mleku

Poleg koncentracij cinka, mangana in selena v pripadajočih tkivih, pri statistično (mejno) signifikantnih rezultatih ANOVA testa, smo kot kovariate vzeli tudi tiste spremenljivke, ki so kazale korelacijo z odvisno spremenljivko po določitvi Pearsonovega oziroma Spearmanovega koeficienta. Rezultate ANCOVA testiranja si lahko ogledamo v **preglednici X**.

Preglednica X: Rezultati ANCOVA testiranja z izbranimi kovariatami za povezavo med polimorfizmom Ile105Val in koncentracijami milkHg ter vrednost korelacije kovariat z milkHg pri materah. S krepkim tiskom smo označili statistično signifikantne rezultate.

Kovariata/e	ANCOVA (milkHg)		Korelacija		Kovariata/e	ANCOVA (milkHg)		Korelacija	
	p	N	r	P		p	N	r	P
M(Se+Zn+Mn)	0,009	103			M(PUFA)	0,171	33	-0,265	0,118
M(Se+Mn)	0,011	103			M(As)	0,048	103	0,401	0,000
M(Se+Zn)	0,027	103			milkAs	0,013	104	0,527	0,000
M(Zn+Mn)	0,009	103			milkMn	0,009	104	0,337	0,000
M(Se)	0,026	103	0,091	0,333	milkSe	0,011	104	0,341	0,000
M(Zn)	0,026	103	0,014	0,882	milkCd	0,019	104	0,290	0,002
M(Mn)	0,010	103	0,166	0,087					

Razlaga kratic: Mn – mangan, Se – selen, Zn – cink, PUFA – večkrat nenasičene maščobne kisline, M – koncentracija v materini krvi, milk – koncentracija v materinem mleku, r – Pearsonov/Spearmanov koeficient korelacije, p – signifikantnost ANCOVA testa, P – signifikantnost Pearsonovega/Spearmanovega testa.

Vse kovariate, z izjemo koncentracije PUFA v materini krvi (le 33 vzorcev), potrjujejo podobno ali napovedujejo celo močnejšo statistično značilno povezavo med

spremenljivkama, kot smo jo določili z ANOVA testom.

4.4.3 Analiza povezanosti kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri nosečnicah s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v različnih bioloških vzorcih

Oba raziskovana polimorfizma posebej povzročita padec aktivnosti encima GSTP (52) ter tako lahko zmanjšata konjugacijo Hg²⁺ ter MeHg na GSH in posledično povzročita njihovo kopičenje v organizmu. Zato smo želeli opredeliti tudi vpliv kombinacije proučevanih polimorfizmov na koncentracije Hg²⁺ ter MeHg v izbranih bioloških vzorcih. Statistično smo analizirali povezavo med kombinacijo dveh genotipov in koncentracijo Hg²⁺ ali MeHg le za biološke vzorce, kjer so se koncentracije Hg²⁺ ali MeHg porazdeljevale normalno. Tako smo izvedli ANOVA teste med kombinacijo polimorfizmov Ala114Val ter Ile105Val pri materah ter koncentracijami Hg²⁺ ali MeHg v materini venski krvi, materinem mleku ter materinih laseh. Rezultate smo predstavili v **preglednici XI**.

Preglednica XI: Rezultati ANOVA testov za kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri materah.

Odvisna spremenljivka - biološki vzorec	ANOVA	
	P	N
lnMHg	0,346	198
MMeHg	0,631	47
lnmilkHg	0,741	107
milkMeHg	0,905	23
lnHHg	0,443	199
lnHMeHg	0,873	44

Razlaga kratic: ln – naravni logaritem, Hg – Hg²⁺, MeHg – metilživo srebro, M – koncentracija v materini krvi, milk – koncentracija v materinem mleku, H – koncentracija v materinih laseh.

V literaturi nismo zasledili študij, ki bi vrednotile pomen kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val na koncentracije Hg²⁺ ali MeHg v bioloških vzorcih. Našli pa smo študije, ki so potrdile vpliv kombinacije izbranih polimorfizmov na razvoj različnih bolezni, kot sta drobnocelični rak pljuč (73) ter astma (74), zlasti preko njihovega vpliva na učinkovitost zaščite pred oksidativnim stresom. V naši preiskovani skupini nobena kombinacija proučevanih polimorfizmov ni bila statistično značilno povezana s koncentracijo Hg²⁺ ali MeHg v nobenem od analiziranih bioloških vzorcev. Glede na

dobljene rezultate lahko zaključimo, da genski spremembi verjetno nista pomembni pri kopičenju Hg^{2+} ali MeHg pri materah. Vendar se moramo zavedati, da je pri majhnem številu vzorcev (vsi biološki vzorci, katerim smo merili koncentracije MeHg) statistična moč povezave nizka. Za nedvoumne rezultate bi morali povečati število vzorcev.

4.4.4 Ugotavljanje povezanosti polimorfizmov Ala114Val ter Ile105Val pri materah in njihovih novorojencih s koncentracijo Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi

Popkovnična kri je pravzaprav zmes materine venske krvi ter iz plodove arterijske krvi. Tako je lahko s koncentracijami Hg^{2+} ter MeHg v popkovnični krvi poleg otrokovega genotipa povezan tudi materin genotip. Zato smo se odločili, da z ANOVA testom preverimo tudi signifikantnost povezav med koncentracijami Hg^{2+} oziroma MeHg v popkovnični krvi ter kombinacijami genotipov obeh izbranih polimorfizmov mater in otrok po parih. Rezultate smo povzeli v **preglednici XII**.

Preglednica XII: Rezultati ANOVA testov za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val za matere in otroke po parih.

Ala114Val matere + novorojenci	ANOVA		Ile105Val matere + novorojenci	ANOVA	
	p	N		p	N
Biološki vzorci			Biološki vzorci		
lnCbHg	0,882	158	lnCbHg	0,596	148
lnCbMeHg	0,226	36	lnCbMeHg	0,242	34

Razlaga kratic: ln – naravni logaritem, Hg – Hg^{2+} , MeHg – metilživo srebro, Cb – koncentracija v popkovnični krvi.

Nobena izmed raziskanih povezav ni bila statistično značilna. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da raziskovana polimorfizma posamično verjetno nimata vpliva na koncentracijo Hg^{2+} ali MeHg v popkovnični kri, tudi če jih testiramo pri materah in novorojencih hkrati. Kljub temu se zavedamo, da je pri nizkem številu vzorcev (CbMeHg) statistična moč povezave nizka. Pri testiranju statističnih povezav med izbranimi polimorfizmi ter koncentracijami zelenih kovin v popkovnični krvi je težavna tudi sama variabilnost biološkega materiala, saj gre za mešano kri matere ter otroka.

4.4.5 Ugotavljanje povezanosti polimorfizma Ala114Val s koncentracijami

Hg²⁺ in MeHg v popkovnični krvi ter v urinu novorojencev

Podobno kot pri materah, smo želeli ugotoviti, ali ima vpliv polimorfizma Ala114Val na aktivnost encima GSTP statistično značilne posledice za koncentracije Hg²⁺ ali MeHg v izbranih bioloških vzorcih pri novorojencih. Na voljo smo imeli dva biološka vzorca; popkovnično kri ter urin novorojencev. Ker pri populaciji slovenskih otrok nismo imeli na voljo podatkov za koncentracije Hg²⁺ v urinu, smo statistično analizo izvajali za populacijo hrvaških ter slovenskih otrok najprej ločeno. Najprej smo določili normalnost porazdelitve odvisne spremenljivke ter glede na to izvedli ANOVA oziroma Kruskal-Wallis test. Pri obravnavi povezanosti polimorfizma Ala114Val s koncentracijami Hg²⁺ oziroma MeHg v popkovnični krvi smo populaciji slovenskih in hrvaških otrok združili. Nato smo testirali statistično značilnost povezav. V **preglednici XIII** imamo na voljo povzetek rezultatov.

Preglednica XIII: Pregled rezultatov ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ala114Val pri novorojencih.

Hrvaški otroci – biološki vzorci	ANOVA		Kruskal-Wallis		Slovenski otroci – biološki vzorci	ANOVA		Hrvaški otroci + slovenski otroci – biološki vzorci	ANOVA	
	p	N	p	N		p	N		p	N
lnCbHg	0,975	172			lnCbHg	0,642	422	lnCbHg	0,715	594
lnCbMeHg	0,917	36			CbMeHg	0,957	14	lnCbMeHg	0,715	63
BuHg			0,144	102						

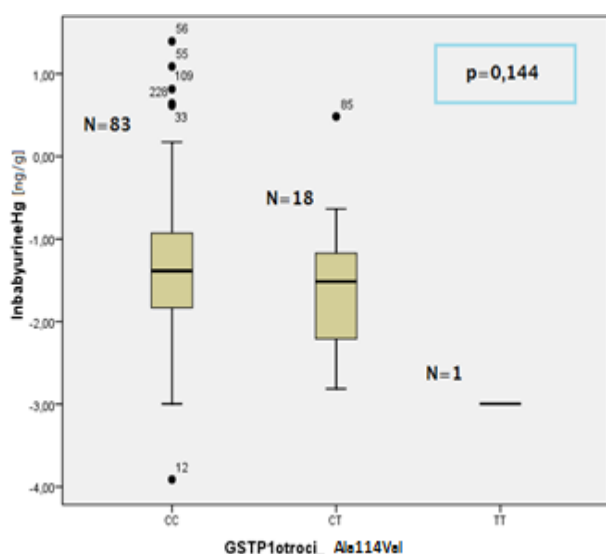
.Razlaga kratic: ln – naravni logaritem, Hg – Hg²⁺, MeHg – metilživo srebro, Cb – koncentracija v popkovnični krvi, Bu – koncentracija v urinu novorojencev.

Iz preglednice razberemo, da nobena obravnavana povezava ni statistično signifikantna.

Čeprav vrednost Kruskal-Wallis testa ne kaže na statistično značilno povezavo med koncentracijami Hg²⁺ v urinu pri hrvaških novorojencih ter genotipom za polimorfizem Ala114Val, smo vseeno izrisali graf (**slika 14**), saj smo želeli pogledati obnašanje koncentracij Hg²⁺ v urinu v odvisnosti od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri hrvaških novorojencih.

Na prvi pogled graf nakazuje padajoči trend koncentracije Hg²⁺ v urinu glede na genotip. Vendar imamo že pri genotipu CT malo vzorcev, pri genotipu TT pa le enega, kar je posledica nizke alelna frekvence alela T pri polimorfizmu Ala114Val. Za bolj jasne rezultate bi bilo potrebno izvesti test na večji populaciji, kjer bi za genotipe CT ter TT

imeli več predstavnikov.



Slika 14: Kvartilni diagram rezultatov odvisnosti koncentracij BuHg od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri hrvaških novorojencih.

Glede na rezultate zaključujemo, da polimorfizem Ala114Val ni povezan s koncentracijami Hg^{2+} ali MeHg v popkovnični krvi novorojencev, povezavo med polimorfizmov Ala114Val in koncentracijami Hg^{2+} urinu novorojencev pa bi bilo smiselno nadalje raziskati.

4.4.6 Ugotavljanje povezanosti polimorfizma Ile105Val s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ter v urinu novorojencev

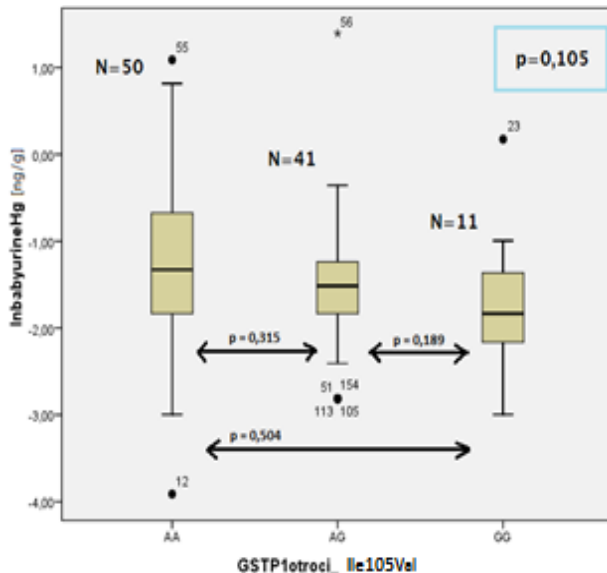
Podobno kot pri materah, smo želeli ugotoviti, ali ima vpliv polimorfizma Ile105Val na aktivnost encima GSTP statistično značilne posledice za koncentracije Hg^{2+} oziroma MeHg v izbranih bioloških vzorcih pri novorojencih. Kot pri prejšnjem poglavju, smo imeli na voljo podatke za koncentracijo Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi tako za slovensko kot hrvaško populacijo novorojencev, podatke za koncentracijo Hg^{2+} v urinu pa smo imeli le za slovenske novorojence. Zato smo se odločili statistično analizo izvesti najprej za populaciji ločeno, nato pa združeno, če je bilo to mogoče. Povezavo med genotipom polimorfizma Ile105Val ter koncentracijami Hg^{2+} ali MeHg smo statistično vrednotili z ANCOVA (normalno porazdeljene odvisne spremenljivke) oziroma s Kruskal-Wallis testom (nenormalno porazdeljene odvisne spremenljivke). Rezultate testov si lahko ogledamo v **preglednici XIV**.

Preglednica XIV: Pregled rezultatov ANOVA in Kruskal-Wallis testov za polimorfizem Ile105Val pri novorojencih.

Hrvaški otroci – biološki vzorci	ANOVA		Kruskal-Wallis		Slovenski otroci – biološki vzorci	ANOVA		Hrvaški otroci + slovenski otroci – biološki vzorci	ANOVA	
	p	N	p	N		p	N		p	N
lnCbHg	0,293	172			lnCbHg	0,214	422	lnCbHg	0,198	594
lnCbMeHg	0,867	36			CbMeHg	0,454	13	lnCbMeHg	0,815	53
BuHg			0,105	102						

Razlaga kratic: ln – naravni logaritem, Hg – Hg^{2+} , MeHg – metilživo srebro, Cb – koncentracija v popkovnični krvi, Bu – koncentracija v urinu novorojencev.

Čeprav noben rezultat ni statistično signifikanten, smo se odločili za grafično predstavitev vrednosti koncentracij Hg^{2+} v urinu glede na genotipske podskupine polimorfizma Ile105Val pri hrvaških novorojencih (**slika 15**). Zanimal nas je trend gibanja koncentracij BuHg v odvisnosti od genotipa za polimorfizem Ile105Val pri hrvaških novorojencih.



Slika 15: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij BuHg od genotipa za polimorfizem Ile105Val pri hrvaških novorojencih.

Opazili smo padajoče koncentracije Hg^{2+} v urinu novorojencev po naslednjem vrstnem redu genotipov: AA, AG, GG. Po istem vrstnem redu genotipov pada tudi aktivnost encima GSTP. Sklepali smo, da prisotnost bolj aktivne različice encima GSTP pripomore k večji eliminaciji Hg^{2+} iz telesa ter tako k višjim koncentracijam Hg^{2+} v urinu. Podobno smo

ugotovili pri testiranju vpliva genotipa polimorfizma Ile105Val pri materah na izločanje Hg^{2+} v materino mleko ($p = 0,023$). Da bi dosegli bolj signifikantno značilno povezavo, bi povečali proučevano populacijo. Potrebno bi bilo tudi testiranje vpliva različnih kovariat na signifikantnost povezave.

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da polimorfizem Ile105Val verjetno ne vpliva na koncentracije Hg^{2+} ali MeHg v popkovnični krvi novorojencev, povezavo med polimorfizmom Ile105Val in koncentracijami Hg^{2+} v urinu novorojencev pa bi bilo smiselno nadalje raziskati.

4.4.7 Ugotavljanje povezanosti kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi novorojencev

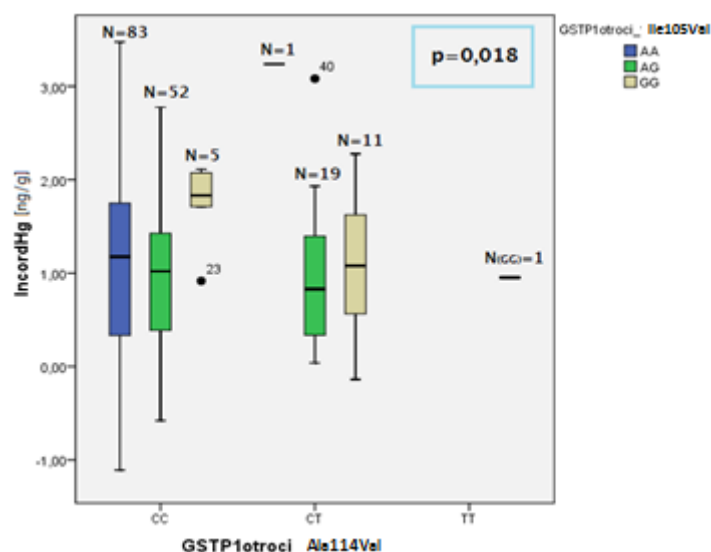
V prejšnjih poglavjih smo izključili posamezen vpliv polimorfizmov Ala114Val ter Ile105Val na koncentracijo Hg^{2+} oziroma MeHg v popkovnični krvi novorojencev. Prav tako smo želeli opredeliti vpliv kombinacije izbranih polimorfizmov na koncentracijo Hg^{2+} oziroma MeHg v popkovnični krvi novorojencev. Podobno kot v prejšnjih dveh poglavjih, smo slovensko in hrvaško populacijo novorojencev testirali najprej ločeno, nato pa tudi združeno. Statistično analizo smo izvedli s pomočjo dvosmerne ANOVA testa, katerega rezultate predstavljamo v **preglednici XV**.

Preglednica XV: Rezultati ANOVA testiranj za kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri novorojencih. S krepkim tiskom smo označili signifikantne rezultate.

Hrvaški otroci – biološki vzorci	ANOVA		Kruskal-Wallis		Slovenski otroci – biološki vzorci	ANOVA		Hrvaški otroci + slovenski otroci – biološki vzorci	ANOVA	
	p	N	p	N		p	N		p	N
lnCbHg	0,018	172			lnCbHg	0,848	422	lnCbHg	0,657	594
lnCbMeHg	0,252	36			CbMeHg	0,814	14	lnCbMeHg	0,162	53

Razlaga kratic: ln – naravni logaritem, Hg: Hg^{2+} , MeHg – metilzivo srebro, Cb- koncentracija v popkovnični krvi.

Ker je vrednost p pri koncentraciji Hg^{2+} v popkovnični krvi pri populaciji hrvaških novorojencev signifikantna, rezultat grafično predstavimo s pomočjo nadgrajenega kvartilnega diagrama (**slika 16**).



Slika 16: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije CbHg od kombinacije genotipov polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri hrvaških novorojencih.

Vpliv le enega vzorca v skupini smo zanemarili. Vzorce smo na abscisni osi razdelili v skupine glede na pripadnost eni od treh različnih genotipov za polimorfizem Ala114Val(C>T): CC, CT in TT. Skupine smo nadalje razdelili glede na pripadnost eni od treh različnih genotipov za polimorfizem Ile105Val(A>G): AA, AG in GG. Tako razdeljenim skupinam vzorcev smo na grafu določili povprečne vrednosti koncentracij Hg²⁺ v popkovnični krvi ter razpršenost vrednosti koncentracij in smo jih primerjali med seboj. V skupini s CC genotipom polimorfizma Ala114Val so koncentracije živega srebra nižje pri posameznikih z genotipom AG od posameznikov z genotipom AA pri polimorfizmu Ile105Val. Najvišje koncentracije CbHg izkazujejo posamezniki z genotipom GG, ne le v skupini CC, pač pa v vseh skupinah. To je skladno z dejstvom, da ravno genotip GG vodi v nastanek najmanj aktivne različice encima GSTP1. V skupini z genotipom CT vidimo podoben, a nekoliko manj izrazit trend; koncentracije Hg²⁺ v popkovnični krvi posameznikov z genotipom GG so najvišje. Vendar so te izrazito nižje v primerjavi s posamezniki z GG genotipom iz skupine CC. Enak test pri populaciji slovenskih otrok ter pri združenih populacijah slovenskih in hrvaških otrok ni pokazal statistično značilne povezave.

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da obstaja verjetnost, da je kombinacija polimorfizmov Ala114Val ter Ile105Val povezana s koncentracijami Hg²⁺ v popkovnični krvi novorojencev. Ker pa statistično značilne povezave nismo ugotovili pri vseh naših testiranih populacijah, za jasnejše rezultate predlagamo analizo tako velike populacije, da bi imeli primerno število mutiranih homozigotov za oba raziskovana polimorfizma.

4.4.7.1 Testiranje vpliva kovariat pri ugotavljanju povezanosti kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val ter koncentracijami Hg²⁺ v popkovnični krvi novorojencev

Poleg koncentracij cinka, mangana in selena v popkovnični krvi, smo kot kovariate vzeli tudi tiste spremenljivke, ki so kazale korelacijo s koncentracijami Hg²⁺ v popkovnični krvi novorojencev po določitvi Pearsonovega oziroma Spermanovega koeficienta. Vpliv kovariatb smo preizkusili z ANCOVA testom, rezultate pa prikazali v **preglednici XVI**.

Preglednica XVI: Rezultati ANCOVA testiranja za povezavo med kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val in koncentracijami CbHg pri hrvaških novorojencih. S krepkim tiskom smo označili statistično značilne rezultate. $P_{ANOVA[CbHg]} = 0,018$.

Kovariata/e	ANCOVA (CbHg)		Korelacija		Kovariata/e	ANCOVA (CbHg)		Korelacija	
	p	N	r	P		p	N	r	P
Cb(Se+Zn+Mn)	0,162	172			CbZn	0,020	172	0,044	0,541
Cb(Se+Mn)	0,096	172			CbMn	0,067	172	0,252	0,000
Cb(Se+Zn)	0,077	172			CbPb	0,034	172	0,204	0,004
Cb(Zn+Mn)	0,091	172			CbAs	0,070	172	0,709	0,000
CbSe	0,058	172	0,325	0,000					

Razlaga kratic: As – arzen, Mn – mangan, Pb – svinec, Se – selen, Zn – cink, Cb – koncentracija v popkovnični krvi, r – Pearsonov/Spearmanov koeficient korelacije, p - signifikantnost ANCOVA testa, P – signifikantnost Pearsonovega/Spearmanovega testa.

Vse kovariate in njihove kombinacije zmanjšajo statistično signifikantnost povezave, ki smo jo določili pri ANOVA testu ($p=0,018$), vendar le pri kombinaciji kovariat Cb(Se+Zn+Mn) p preseže vrednost 0,1.

4.4.8 Ostali statistično značilni rezultati

Statistično smo želeli ovrednotiti povezavo genotipov obeh izbranih polimorfizmov pri materah in novorojencih tudi s koncentracijami mangana, selena in cinka ter opredeliti njihovo morebitno povezavo s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg v pripadajočih bioloških vzorcih. V tem poglavju smo izpostavili le statistično signifikantne povezave, povzetek rezultatov statistične analize ostalih povezav si lahko ogledamo v **preglednici XXIV** (7. poglavje – Priloge).

4.4.8.1 Povezava polimorfizma Ala114Val ter koncentracij selena v popkovnični krvi pri slovenskih novorojencih

V literaturi omenjajo, da selen zmanjša prehod anorganskih oblik živega srebra preko placente (75), prav tako da ščiti pred škodljivimi učinki MeHg (76). Glede na to, da predvidevamo, da polimorfizem Ala114Val vpliva na koncentracije Hg²⁺ in MeHg v različnih bioloških vzorcih, smo želeli preveriti tudi vpliv izbranega polimorfizma na koncentracije selena v pripadajočih bioloških vzorcih. Izvedli smo ANOVA teste, pri katerih smo med genotipskimi podskupinami proučevanega polimorfizma in koncentracijami selena v popkovnični krvi slovenskih novorojencev zaznali mejno statistično povezavo. To smo nadalje raziskali s primernimi ANCOVA testi, kar si lahko ogledamo v **preglednici XVII**.

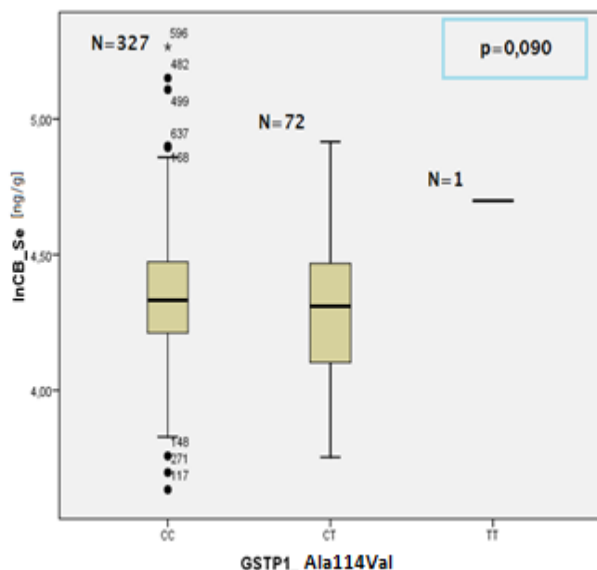
Preglednica XVII: Rezultat testiranja ANOVA in ANCOVA z izbranimi kovariatami za povezavo med polimorfizmom Ala114Val ter koncentracijami CbSe pri slovenskih novorojencih. S krepkim tiskom smo označili statistično značilne rezultate.

ANOVA (CbSe)		ANCOVA			Korelacija	
p	N	Kovariata/e	p	N	r	P
0,090	400	Cb(Mn+Zn)	0,007	400		
		CbMn	0,022	400	0,304	0,000
		CbZn	0,031	400	0,364	0,000
		CbPb	0,046	400	0,296	0,000
		CbCu	0,082	400	0,444	0,000
		CbAs	0,109	400	0,219	0,000

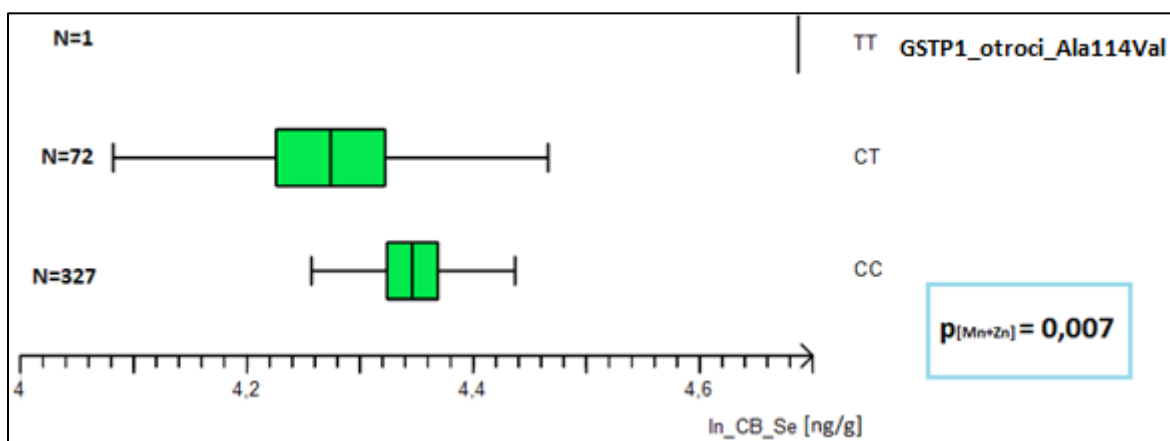
Razlaga kratic: As – arzen, Cu – baker, Mn – mangan, Pb – svinec, Se – selen, Zn – cink, Cb – koncentracija v popkovnični krvi, r – Pearsonov/Spearmanov koeficient korelacije, p - signifikantnost ANCOVA testa, P – signifikantnost Pearsonovega/Spearmanovega testa.

Ob upoštevanju kovariat smo dobili statistično značilno povezavo med spremenljivkama, razen ob upoštevanju kovariat CbAs in CbCu, pri katerih p preseže vrednost 0,05.

Raziskovano povezavo smo ovrednotili tudi grafično s kvartilnim diagramom na **sliki 17**, z upoštevanjem kovariate Cb(Mn+Zn) pa smo dobili kvartilni na **sliki 18**, kjer je p(Mn+Zn) statistično značilen.



Slika 17: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbSe od genotipov polimorfizma Ala114Val pri slovenskih novorojencih.



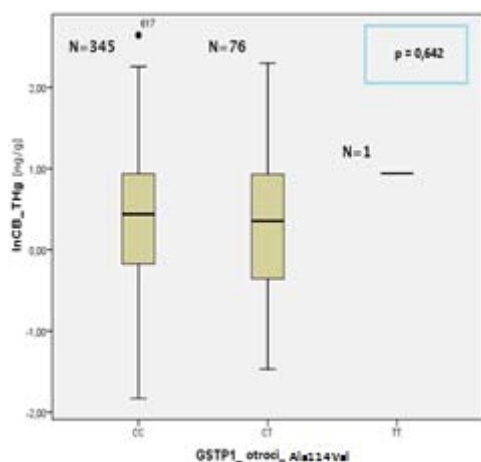
Slika 18: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbSe od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri slovenskih novorojencih. Izračun povprečnih, kvartilnih ter skrajnih vrednosti CbSe je prilagojen glede na združen vpliv kovariat CbMn in CbZn.

Vpliv le enega vzorca v skupini smo zanemarili. Iz **slik 17** in **18** lahko razberemo, da so koncentracije selena v popkovnični krvi pri skupini z genotipom CC nekoliko višje od koncentracij pri skupini z genotipom CT.

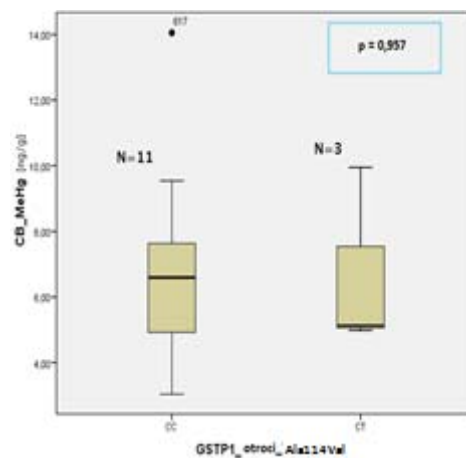
Za bolj popolno interpretacijo rezultatov, smo primerjali obnašanje koncentracij selena v popkovnični krvi ter koncentracij Hg^{2+} oziroma MeHg v popkovnični krvi, zato smo grafično predstavili tudi koncentracije Hg^{2+} ter MeHg v popkovnični krvi v odvisnosti od genotipa Ala114Val (**slika 19**, **slika 20**).

Če primerjamo **sliki 18** in **19**, opazimo, da se koncentracije selena v popkovnični krvi ter Hg^{2+} v popkovnični v odvisnosti od genotipov polimorfizma Ala114Val obnašajo zelo podobno; le te so višje pri genotipu CC višje kot pri genotipu CT, vendar razlika ni

statistično značilna.



Slika 19: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbHg od genotipov polimorfizma Ala114Val pri slovenskih novorojencih.



Slika 20: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij CbMeHg od genotipov polimorfizma Ala114Val pri slovenskih novorojencih.

Na **sliki 20** prav tako vidimo podoben trend; koncentracije MeHg v popkovnični krvi so pri genotipu CC višje od tistih pri genotipu CT, s tem da je razlika med povprečnimi koncentracijami večja. Glede na to, da selen dokazano ščiti pred toksičnimi učinki živosrebrovih spojin ter preprečuje njihovo prehajanje preko placente (75,76), smo domnevali, da bi se lahko koncentracije selena v popkovnični krvi povišale kot kompenzacija na račun endogenih virov zaradi vzpostavljanja učinkovitejše obrambe pri višjih koncentracijah Hg^{2+} oziroma MeHg v popkovnični krvi. Vendar se moramo zavedati, da razlike med povprečnimi koncentracijami med genotipskimi skupinami tako za koncentracije Hg^{2+} kot MeHg v popkovnični krvi niso statistično značilne. Prav tako imamo pri vrednotenju povezave med koncentracijami MeHg v popkovnični krvi ter genotipskimi podskupinami polimorfizma Ala114Val zelo malo vzorcev, zaradi česar je statistična moč povezave zelo šibka. Zaključili smo, da bi bilo potrebno nadaljnje raziskovanje omenjenih povezav.

4.4.8.2 Povezava polimorfizma Ala114Val ter koncentracij mangana v venski krvi pri nosečnicah

Ker mangan preko delovanja superoksid-dismutaze (Mn-SOD) ščiti pred oksidativnim stresom, povzročeni z živim srebrom (67), smo želeli preveriti vpliv polimorfizma Ala114Val na koncentracije mangana v pripadajočih bioloških vzorcih. V ta namen smo

izvedli primerne ANOVA teste, pri katerih smo zaznali signifikantno povezavo med genotipskimi podskupinami izbranega polimorfizma ter koncentracijo mangana v venski krvi pri materah. To smo nadalje raziskali z ANCOVA testi, katerih rezultate predstavljamo v **preglednici XVIII**.

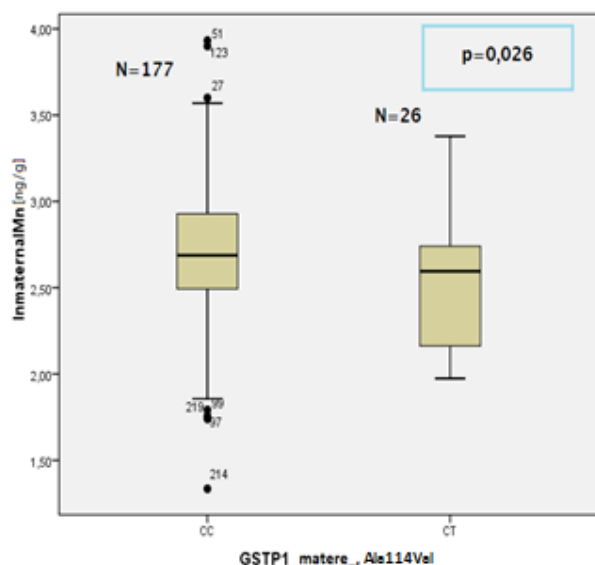
Preglednica XVIII: Rezultati ANOVA in ANCOVA testiranja z izbranimi kovariatami za povezavo polimorfizma Ala114Val ter koncentracij MMn pri nosečnicah. S krepkim tiskom smo označili statistično značilne rezultate.

ANOVA (MMn)		ANCOVA			Korelacija	
p	N	Kovariata/e	p	N	r	P
0,026	203	M(Se+Zn)	0,011	203		
		MSe	0,031	203	0,281	0,000
		MZn	0,011	203	0,408	0,000
		MAs	0,028	203	0,128	0,048
		MCd	0,017	203	0,285	0,000
		MPb	0,069	203	0,391	0,000
		MCu	0,059	203	0,118	0,037
		PUFA	0,006	203	-0,323	0,015

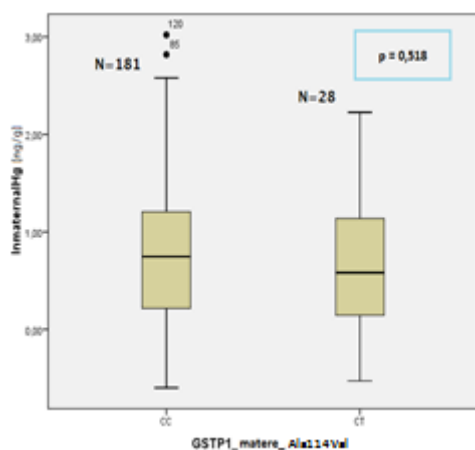
Razlaga kratic: As – arzen, Cd – kadmij, Cu – baker, Se – selen, Zn – cink, PUFA – večkrat nenasičene maščobne kisline, M – koncentracije venske krvi mater, r – Pearsonov/Spearmanov koeficient korelacije, p - signifikantnost ANCOVA testa, P – signifikantnost Pearsonovega/Spearmanovega testa.

Pri upoštevanju kovariat MPb in MCu, se signifikantnost povezave zmanjša. Vse ostale kovariate potrjujejo, da je povezava statistično signifikantna.

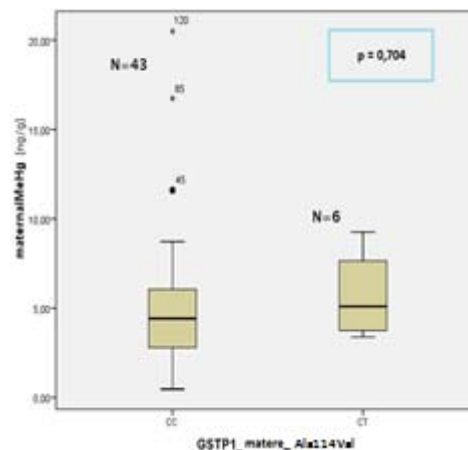
Raziskovano povezavo smo tudi grafično ovrednotili s kvartilnim digramom na **sliki 21**, iz katerega razberemo, da so povprečne koncentracije mangana v materini venski krvi pri skupini z genotipom CC višje od tistih z genotipom CT. Za bolj popolno interpretacijo rezultatov, smo primerjali obnašanje koncentracij mangana v materini venski krvi ter Hg²⁺ oziroma MeHg v materini venski krvi odvisnosti od genotipa za polimorfizem Ala114Val (**slika 22**, **slika 23**). Če primerjamo **sliki 21** in **22**, opazimo podobno obnašanje koncentracij mangana v materini venski krvi in Hg²⁺ v materini venski krvi; pri skupini z genotipom CC so koncentracije višje kot pri skupini z genotipom CT, vendar so razlike med povprečnimi vrednostmi koncentracij Hg²⁺ v materini venski krvi med genotipskimi podskupinami statistično neznačilne.



Slika 21: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij MMn od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri nosečnicah.



Slika 22: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij MHg od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri nosečnicah.



Slika 23: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracij MMeHg od genotipa za polimorfizem Ala114Val pri nosečnicah.

Slika 23 kaže, da so koncentracije MeHg v materini venski krvi višje pri skupini z genotipom CT kot pri skupini z genotipom CC. Vendar je tudi tu razlika statistično neznačilna, obenem se moramo zavedati majhnega števila vzorcev. Domnevali smo, da bi obratni trend obnašanja koncentracij Hg^{2+} in MeHg v materini venski krvi lahko bil posledica različnih učinkovitosti konjugacije Hg^{2+} in MeHg z različnimi genotipskimi variacijami polimorfizma Ala114Val pri encimu GSTP1 in tako različnih hitrosti eliminacije. Genotipska podskupina CC bi tako lahko imela večjo razpoložljivost GSH za vezavo z MeHg, genotipska podskupina CT pa z Hg^{2+} . Zaključili smo, da bi bilo povezavo zanimivo natančneje obravnavati.

4.4.8.3 Povezava kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val ter koncentracij cinka v venski krvi pri nosečnicah

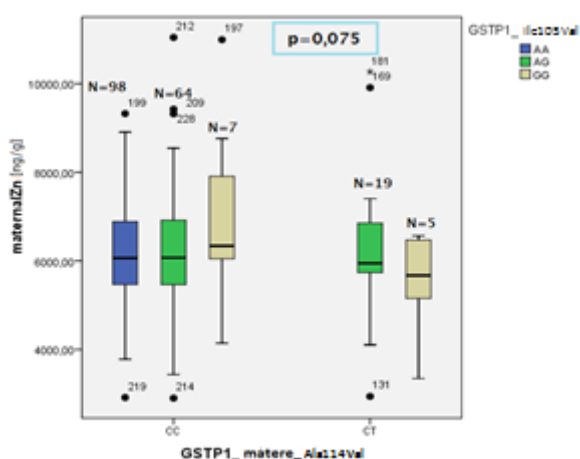
Cink ščiti pred posledicami z živim srebrom povzročene oksidativnega stresa preko delovanja superoksid-dismutaze (Zn-SOD) (69), poleg tega pa je sposoben indukcije metalotioneinov, ki z visoko afiniteto vežejo anorgansko živo srebro in tako pomagajo pri detoksifikaciji (77). Zato smo želeli preveriti vpliv kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val na koncentracije cinka v pripadajočih bioloških vzorcih. V tem namen smo izvedli ANOVA teste, pri katerih smo zaznali statistično mejno signifikantno povezavo med genotipskimi podskupinami proučevanih polimorfizmov ter koncentracijami cinka v venski krvi mater pri materah. To povezavo smo nadalje raziskali s primernimi ANCOVA testi, katerih rezultate predstavljamo v **preglednici XIX**.

Preglednica XIX: Rezultati ANOVA in ANCOVA testiranja z izbranimi kovariatami za povezavo med kombinacijo polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val ter koncentracijami MZn pri nosečnicah. S krepkim tiskom smo označili rezultat, ki se najbolj približa statistično značilni vrednosti.

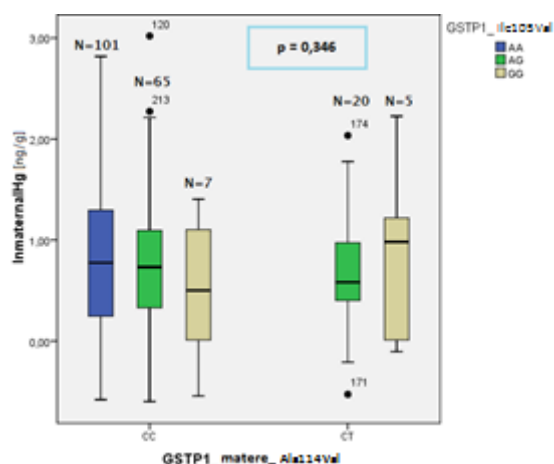
ANOVA (MZn)		ANCOVA			Korelacija	
p	N	Kovariata/e	P	N	r	P
0,075	193	M(Se+Mn)	0,501	193		
		MSe	0,255	193	0,654	0,000
		MMn	0,255	193	0,475	0,000
		MCd	0,119	193	0,235	0,001
		MPb	0,092	193	0,418	0,000

Razlaga kratic: Cd – kadmij, Mn – mangan, Pb – svinec, Se – selen, Zn – cink, M – koncentracije v venski krvi hrvaških nosečnic, r – Pearsonov/Spearmanov koeficient korelacije, p - signifikantnost ANCOVA testa, P – signifikantnost Pearsonovega/Spearmanovega testa.

Iz preglednice lahko razberemo, da ob upoštevanju kovariat signifikantnost povezave močno pade; vse vrednosti p, razen pri kovariati MPb, so nad 0'1. Ob tem smo posumili, da je rezultat ANOVA testa naključen, vendar smo povezavo kljub temu grafično ovrednotili z nadgrajenim kvartilnim diagramom (**slika 24**). Iz tega razberemo, da so povprečne koncentracije cinka v materini krvi v skupini CC za polimorfizem Ala114Val višje tako pri posameznikih z genotipom AG kot z genotipom GG za polimorfizem Ile105Val od pripadajočih koncentracij v skupini CT. Zanimivo je, da imajo v skupini z genotipom CC posamezniki z genotipom GG najvišje koncentracije cinka v venski materini krvi, v skupini z genotipom CT pa imajo posamezniki z genotipom GG najnižje koncentracije cinka v venski materini krvi.



Slika 24: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije MZn od kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri nosečnicah.



Slika 25: Kvartilni diagram odvisnosti koncentracije MHg od kombinacije polimorfizmov Ala114Val in Ile105Val pri nosečnicah.

Da bi pomen koncentracij cinka v venski materini krvi razjasnili, smo izrisali tudi nadgrajen kvartilni diagram odvisnosti koncentracije Hg^{2+} v venski materini krvi od kombinacije polimorfizmov Ala114Val ter Ile105Val pri materah (**slika 25**). Iz tega razberemo, da imajo posamezniki z genotipom GG polimorfizma Ile105Val v skupini z genotipom CC polimorfizma Ala114Val povprečno najnižje, posamezniki z genotipom GG polimorfizma Ile105Val v skupini z genotipom CT polimorfizma Ala114Val pa povprečno najvišje koncentracije Hg^{2+} v venski materini krvi. Najvišje in najnižje koncentracije cinka v venski materini krvi so na ravno obratnih mestih v pripadajočih kvartilnih diagramih; kjer so koncentracije Hg^{2+} v venski materini krvi višje, tam so koncentracije cinka v venski materini krvi nižje. Domnevali smo, da se cink porablja v celicah pri zaščiti pred posledicami z živim srebrom povzročene oksidativnega stresa. Zanimivo je tudi, da so vsi nosilci genotipa AA polimorfizma Ile105Val hkrati tudi nosilci genotipa CC polimorfizma Ala114Val, kar nakazuje na povezanost obeh polimorfizmov. Nosilci obeh mutiranih alelov tako polimorfizma Ala114Val kot polimorfizma Ile105Val predstavljajo tudi rizični dejavnik za nižje koncentracije cinka v krvi zaradi njegove večje porabe ob manjši razpoložljivosti GSH pri zmanjšani aktivnosti encima GSTP1. Zaključujemo, da bi bilo povezavo zanimivo nadalje raziskati.

5 ZAKLJUČEK

Diplomsko delo zaključujemo z izpostavitvijo najbolj zanimivih rezultatov.

GSTP1 Ile105Val (rs1695)

- Polimorfizem Ile105Val je pri materah statistično značilno povezan z koncentracijami Hg^{2+} v materinem mleku ($p = 0,023$). Ugotovili smo, da imajo matere z genotipom GG statistično značilno nižje koncentracije Hg^{2+} v mleku kot matere z genotipom AA ter AG.
- Polimorfizem Ile105Val pri materah ni statistično značilno povezan s koncentracijami Hg^{2+} v materinem urinu ($p = 0,115$), vendar smo ob proučevanju povezave zasledili zanimiv trend. Koncentracije Hg^{2+} v urinu mater padajo po enakem vrstnem redu genotipov kot aktivnost encima GSTP1: AA, AG, GG.
- Polimorfizem Ile105Val pri novorojencih ni statistično značilno povezan s koncentracijami Hg^{2+} v urinu novorojencev ($p = 0,105$). Vendar spet zasledimo trend padanja koncentracij Hg^{2+} v urinu novorojencev po enakem vrstnem redu genotipov kot pada aktivnost encima GSTP1: AA, AG, GG.

GSTP1 Ala114Val (rs1138272)

- Polimorfizem Ala114Val pri novorojencih ni statistično povezan s koncentracijami Hg^{2+} v urinu novorojencev ($p = 0,144$), vendar tudi v tem primeru koncentracija Hg^{2+} v urinu novorojencev pada po istem vrstnem redu genotipov kot pada aktivnost encima GSTP1: CC, CT.
- Polimorfizem Ala114Val je pri populaciji slovenskih novorojencev statistično povezan s koncentracijami selena v popkovnični krvi ($p = 0,007$). Skupina novorojencev z genotipom CC izkazuje višje koncentracije selena v popkovnični krvi od skupine novorojencev s CT genotipom. Prav tako imajo novorojenci z genotipom CC višje koncentracije Hg^{2+} ter MeHg v popkovnični krvi ($p_{\text{Hg}} = 0,642$, $p_{\text{MeHg}} = 0,957$).
- Polimorfizem Ala114Val pri populaciji mater statistično značilno vpliva na koncentracijo kovin v venski krvi, ki lahko vplivajo na raven oksidativnega stresa: mangan, cink, baker, svinec ($p_{\text{Mn}} = 0,026$, $p_{\text{Zn}} = 0,075$, $p_{\text{Cu}} = 0,026$, $p_{\text{Pb}} = 0,035$).

GSTP1 Ile105Val + Ala114Val

- Kombinacija polimorfizmov Ile105Val ter Ala114Val pri novorojencih je statistično povezana s koncentracijami Hg^{2+} v popkovnični krvi ($p = 0,018$). Najvišje povprečne koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi so izkazovali novorojenci z genotipom GG za polimorfizem Ile105Val, ne glede na pripadnost genotipski podskupini za polimorfizem Ala114Val. Genotip GG polimorfizma Ile105Val daje najmanj aktivno različico encima GSTP1.

Glede na rezultate lahko zaključimo, da bi lahko bil genotip GG pri polimorfizmu Ile105Val biološki označevalec za manj učinkovito prehajanje Hg^{2+} v mleko in urin pri materah ter v urin pri novorojencih. Na ta način sta tako mati kot novorojenec lahko izpostavljena kopičenju in višjim koncentracijam Hg^{2+} v organizmu, kar potrjujejo naši rezultati, saj so novorojenci z genotipom GG polimorfizma Ile105Val, ob upoštevanju genotipske podskupine polimorfizma Ala114Val, imeli višje koncentracije Hg^{2+} v popkovnični krvi.

Za prihodnje študije predlagamo povečanje števila vzorcev testirane populacije, zlasti ob proučevanju vpliva polimorfizma Ala114Val, kjer ima mutirani alel T nizko alelnu frekvenco. Tako bi tudi povečali statistično moč testov. Za večjo statistično moč testov bi bilo potrebno tudi povečati število bioloških vzorcev z opravljenimi meritvami za koncentracije MeHg. Predlagamo tudi raziskovanje populacije, ki bi imela večji razpon koncentracij Hg^{2+} in MeHg v izbranih bioloških vzorcih. Populacije slovenskih in hrvaških novorojencev ter hrvaških mater imajo namreč povprečno nizke koncentracije Hg^{2+} v bioloških tkivih, zato rezultati testov pogosto niso statistično značilni. Nadalje bi ovrednotili pomen polimorfizmov za klinični izid, ki bi bil v našem primeru nevrološko stanje novorojenca. Tako bi lahko za posamezen genotip določili tveganje za pojav kliničnih znakov glede na izpostavljenost ploda živosrebrnim spojinam pred rojstvom.

6 LITERATURA

1. Atkins, Overton, Rourke, Weller, Armstrong: Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry, 5th Edition, 2010: 257-264.
2. Klaasen: Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 6th Edition, 2001: 812-815.
3. Danyal, Blake, Andrea, Rusinyak: Heavy metal poisoning: Clinical presentations and pathophysiology, 2006: 67-68.
4. Klaasen: Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 6th Edition, 2001: 816-820.
5. Nordberg GF, Fowler, Nordberg M, Friberg: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, 2007: 39-42
6. Černe: Toksikologija (težkih) kovin, Medicinski Razgledi 48: 83-100, 2009.
7. Ashraf: Levels of Heavy Metals in Popular Cigarette Brands and Exposure to These Metals via Smoking, ScientificWorld Journal, 2012; 72-77.
8. Rangasami M, Rajendran, Chakko, Rangasami J, Khalil, Alam, Tan: Aluminium exposure in haemodialysis and peritoneal dialysis patients: Experience of a single centre, Brunei Int Med J, 8 (4), 2012: 173-178
9. Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson, Loscalzo: Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition, 2012: 1457-1462.
10. Klaasen: Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 6th Edition, 2001: 834-837.
11. Papanikolaou, Hatzidaki, Belivanis, Tzanakakis, Tsatsakis: Lead toxicity update. A brief review, Med Sci Monit 11, 2005: 329-336.
12. Università degli studi G. d'Annunzio, Dipartimento di Farmacia, Chieti-Pescara: http://farmacia.unich.it/farmacologia/didattica/tossicologia/dia/metalli_pesanti.pdf, podatki pridobljeni 17.12. 2012
13. Sutoo, Akiyama, Imamiya: A mechanism of cadmium poisoning: The cross effect of calcium and cadmium in the calmodulin-dependent system, Arch Toxicol 64, 1990: 161-164.
14. Bernhoft: Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature, J Environ Public Health, 2012: 273-283.

15. Patrick: Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha lipoic acid in the treatment of mercury toxicity, *Altern Med Rev*, 7(6), 2002: 456-471.
16. Delovni dokument služb Komisije - Spremni dokument predloga uredbe Evropskega parlamenta in Sveta o prepovedi izvoza in varnem skladiščenju živega rebra: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=SEC:2006:1370:FIN:SL:HTML>, podatki pridobljeni: 10.10.2012
17. Al-Saleh, Al-Sedairi: Mercury (Hg) burden in children: The impact of dental amalgam, *Sci Total Environ*, 2012: 62-74.
18. Nordberg, Fowler, Nordberg, Friberg: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, 2007: 684-693.
19. Concise International Chemical Assessment Document 50: Elemental mercury and inorganic mercuric compounds: Human health aspects, WHO, 2003: 12-16.
20. Hazardous substances data bank; Mercury, elemental, National library of medicine: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+7439-97-6>, podatki pridobljeni 11.10.2012
21. Warfvinge: Mercury Distribution in the Neonatal and Adult Cerebellum after Mercury Vapor Exposure of Pregnant Squirrel Monkeys, *Environ Res*, 83(2), 2000: 93-101.
22. Morgan, Chanda, Price, Fernando, Liu, Brambila, O'Connor, Beliles, Barone Jr.: Disposition of Inhaled Mercury Vapor in Pregnant Rats: Maternal Toxicity and Effects on Developmental Outcome, *Toxicol Sci*, 66(2), 2002: 261-273.
23. Kozak, Forsberg: Transformation of mercuric chloride and methylmercury by the rumen microflora, *Appl Environ Microbiol*, 38(4), 1979: 626-636.
24. Lodowska, Wolny, Jaworska-Kik, Kurkiewicz, Dzierzewicz, Weglarz: The Chemical Composition of Endotoxin Isolated from Intestinal Strain of *Desulfovibrio desulfuricans*, *The Scientific World Journal*, 2012: 88-98.
25. Klaasen: Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 6th Edition, 2001: 840-848.
26. Nordberg, Fowler, Nordberg, Friberg: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, 2007: 697-703.
27. Jarosinska, Horvat, Sällsten, Mazzolai, Dabkowska, Prokopowicz, Biesiada,

- Barregard: Urinary mercury and biomarkers of early renal dysfunction in environmentally and occupationally exposed adults: A three-country study, *Environ Res* 108, 2008: 224-232.
28. Schaefera, Rocksa, Zheng, Liang, Gub B, Morel: Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 2011: 8714-8719.
29. Horvat: Mercury as a global pollutant, *Anal Bioanal Chem* 374, 2002, 981-982.
30. Yorifuji, Tsuda, Inoue, Takao, Harada: Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan, *Environ Int* 37, 2011: 907-913.
31. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council : Toxicological Effects of Methylmercury, National Academy of Sciences, 2000: 13-31.
32. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council : Toxicological Effects of Methylmercury, National Academy of Sciences, 2000: 31-72.
33. Harada: Congenital Minamata disease: Intrauterine methylmercury poisoning, *Birth Defects Research* 88: Clinical and Molecular teratology, 2010: 906-909.
34. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council : Toxicological Effects of Methylmercury, National Academy of Sciences, 2000: 161-264.
35. Heron, Golding, ALSPAC Study Team: Cohort Study in the United Kingdom Does Not Support a Causal Association Thimerosal Exposure in Infants and Developmental Disorders: A Prospective, *Pediatrics*, 114(3), 2011: 577-584.
36. Geier, Geier: A comparative evaluation of the effects of MMR immunization and mercury doses from thimerosal-containing childhood vaccines on the population prevalence of autism, *Med Sci Monit* 10, 2004: 33-39.
37. Divine, Ayala-Fierro, Barber, Carter: Glutathione, albumin, cysteine, and cys-gly effects on toxicity and accumulation of mercuric chloride in LLC-PK1 cells, *J Toxicol Environ Health A*, 57(7), 1999: 489-505.
38. Farina, Rocha, Aschner: Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies, *Life Sci*, 2011: 555-563.

39. Becker, Soliman: The Role of Intracellular Glutathione in Inorganic Mercury-Induced Toxicity in Neuroblastoma Cells, *Neurochem Res*, 34(9), 2009: 1677-1684
40. Sen: Nutritional biochemistry of cellular glutathione, *J Nutr Biochem*, 8(12), 1997: 660-672.
41. Ballatori, Krance, Notenboom, Shi, Tieu, Hammond : Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases, *Biol Chem* 390, 2009: 191-214.
42. . Lushchak: Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions, *J Aminoacids*, 2012: 1-26.
43. Wang, Ballatori: Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions, *Pharmacol Rev*, 50(3), 1998: 337-353.
44. Farmaceutvska kemija III, Vaje in seminarji: Antioksidanti: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf, podatki pridobljeni 17.12.2012
45. Več avtorjev: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja, 2001: 15-36.
46. Sheehan, Meade, Foley, Dowd: Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *J Biochem*, 2001: 1-16.
47. Klaasen: Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 6th Edition, 2001: 213-224.
48. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09211> , podatki pridobljeni: 31.10.2012
49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2950>, podatki pridobljeni: 31.10.2012
50. https://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResults?searchMode=keyword&CID=&productTypeSelect=genotyping&alternateTargetTypeSelect=&targetTypeSelect=snp_all&species=Homo+sapiens&otherSpecies=&keyword=Ile105Val&batchUpload= , podatki pridobljeni: 31.10.2012
51. https://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResults?searchMode=keyword&CID=&productTypeSelect=genotyping&alternateTargetTypeSelect=&targetTypeSelect=snp_all&species=Homo+sapiens&otherSpecies=&keyword=Ala114Val&batchUpload= , podatki pridobljeni: 31.10.2012

52. Moyer, Salavaggione, Wu, Moon, Eckloff, Hildebrandt, Schaid, Wieben, Weinshilboum: Glutathione S-Transferase P1: Gene Sequence Variation and Functional Genomic Studies, *J Can Res*, 68(12), 2009: 4791-4801.
53. Amer, Ghattas, Abo-ElMatty, Abou-El-Ela: Evaluation of glutathione S-transferase P1 genetic variants affecting type-2 diabetes susceptibility and glycemic control, *Archives of Medical Science*, 8(3), 2012: 631-636.
54. Chelbi, Lachheb, Ammar, Hamzaoui K, Hamzaoui A: Association of *GST* Genes Polymorphisms with Asthma in Tunisian Children, *Mediators Inflamm*, 2007: 195-200.
55. Vähäkangas, Myllynen: Drug transporters in the human blood-placental barrier, *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 2009: 665-678.
56. Yoshida: Placental to fetal transfer of Mercury and Fetotoxicity, *Tohoku J Exp Med*, 196(2), 2002: 79-88.
57. Bridges, Joshee, Zalups: Effect of DMPS and DMSA on the placental and fetal disposition of methylmercury, *Placenta*, 30(9), 2009: 800-805.
58. <http://www.chromatography-online.org/directory/methdcat-16/page.html>, GC/ECD, Library 4 Science, podatki pridobljeni 13.01.2013
59. <http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html>, Introduction to ICP-MS, Crustal Geophysics and Geochemistry Science Center, podatki pridobljeni 13.01.2013
60. <http://www.chromatography-online.org/directory/methdcat-2/page.html>, GC-FID, Library for Science, podatki pridobljeni 13.01.2013
61. Protokol DNA purification from tissues iz priročnika QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, 3rd Edition, QIAGEN, 2010: 33-36.
62. Različni avtorji: Chapter 10: PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*, Centers for Disease Control and Prevention, 2010: 3.
63. https://www.sbd.ee/pics/6414_Data_Sheet_5xHOT_FIREPol_Probe_qPCR_Mix_Plus_ROX.pdf, 5x HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus (ROX) Data Sheet, Solis BioDyne, podatki pridobljeni 15.01. 2013
64. http://www.nfstc.org/pdi/Subject07/pdi_s07_m01_02.htm, NFSTC; Science serving justice, DNA Analyst Training, podatki pridobljeni 30.01. 2013

65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1138272, podatki pridobljeni 31.01. 2013
66. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1695, podatki pridobljeni 31.01. 2013
67. Nordberg, Fowler, Nordberg, Friberg: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, 2007: 657-666.
68. Ralston, Raymond: Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, Toxicology 278, 2009: 112-123.
69. Nordberg, Fowler, Nordberg, Friberg: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, 2007: 925-934.
70. Gundacker, Wittmann, Kukuckova, Komarnicki, Hikkel, Gencik: Genetic background of lead and mercury metabolism in a group of medical students in Austria, Environ Res J 109, 2009: 786-796.
71. Custodio, Broberg, Wennberg, Jansson, Vessby, Hallmans, Stegmayr, Skerfving: Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention, Arch Environ Health 59(11), 2004, 588-595.
72. Björnberg, Vahter, Berglund, Niklasson, Blennow, Sandborgh-Englund: Transport of Methylmercury and Inorganic Mercury to the Fetus and Breast-Fed Infant, Environ Health Perspect, 133(10), 2005, 1381-1385.
73. Vural, Yakar, Derin, Saip, Yakar, Demirkan, Karabulut, Ugurel, Cine, Kilicaslan, Tüzün, Ozbek: Evaluation of glutathione S-transferase P1 polymorphisms (Ile105Val and Ala114Val) in patients with small cell lung cancer, Genet Test Mol Biomarkers, 16(7), 2012, 701-706.
74. Schultz, Devadason, Khoo, Zhang, Bizzantino, Martin, Goldblatt, Laing, Le Souëf, Hayden: The role of GSTP1 polymorphisms and tobacco smoke exposure in children with acute asthma, J Asthma, 47(9) 2010, 1049-1056.
75. Skerfving: Interaction between Selenium and Methylmercury, Environ Health Perspect 25, 1978: 57-65.
76. Watanabe: Modification of Mercury Toxicity by Selenium: Practical Importance?, Tohoku J Exp Med, 196(2), 2002: 71-77.
77. Hijova: Metallothionein and zinc: their functions and interactions, Bratislavske Lekarske Listy, 105(56), 2004; 230-234.

7 PRILOGE

Preglednica XX: značilnosti nosečnic; X =parameter, N =frekvenca, \bar{X} = povprečna vrednosti, SD =standardna deviacija.

X	N	$\bar{X} \pm SD$
Starost matere [leta]		
<30	79	30,42±4,71
30-35	80	
>35	24	
ITM pred nosečnostjo [kg/m³]		
<18,5	10	23,17±4,31
18,5-24,9	132	
>24,9	41	
ITM po porodu [kg/m³]		
<18,5	0	28,77±4,21
18,5-24,9	25	
>24,9	158	
Vnos rib [g/teden]		
<150	29	303±193,23
150-300	97	
301-450	46	
451-600	26	
>600	10	
Vnos alkohola pred nosečnostjo [enote/teden]		
<7	43	9,49±3,65
7-14	129	
> 14	18	
Kadilski status		
nekadilka	109	
kadilka	14	
bivša kadilka (kajenje 1-5 let)	9	
bivša kadilka (kajenje 6-10 let)	20	
bivša kadilka (kajenje >10 let)	22	

Preglednica XXI: Rezultati genotipizacije za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val pri preiskovani populaciji. Modro polje: hrvaške matere, zeleno polje: hrvaški novorojenci, rožnato polje: slovenski novorojenci, sivo polje: vzorca ni.

Hrvaške matere			Hrvaški novorojenci		
Številka vzorca	Genotip za Ala114Val	Genotip za Ile105Val	Številka vzorca	Genotip za Ala114Val	Genotip za Ile105Val
100001			110001	CT	GG
100003			110003	CC	AA
100004			110004	CC	AA
100005			110005	CC	AA
100006			110006	CC	AG
100008			110008	CC	AA
100009			110009	CC	AG
100010			110010	CC	AA
100012	CC		110012	CC	AA
100013	CC		110013	CC	AG
100015	CC	AA	110015	CC	AA
100016	CC		110016	CC	AA
100017	CC	AG	110017		
100018	CC	GG	110018	CC	GG
100020			110020	CC	AG
100021	CC	AA	110021		
100022	CC		100022	CC	AA
100023	CC	AA	110023	CC	GG
100024	CC	AA	110024	CC	AA
100025	CT	AG	110025	TT	GG
100026	CC	AA	110026	CC	AA
100027	CC	AG	110027	CC	AA
100028	CC	AA	110028		
100029	CC	AG	110029	CC	AG
100030	CC	AA	110030	CC	AA
100031	CC	AA	110031	CC	AA
100032	CC	AA	110032	CC	AA
100033	CC	AA	110033	CC	AA
100035	CC	AG	110035	CC	AG
100036	CC	AG	110036	CC	AG
100037	CC	AG	110037	CC	GG

100038	CC	AA	110038	CC	AA
100039	CC	AA	110039	CC	AA
100040	CC	AA	110040	CT	AG
100041	CC	AG	110041	CC	AG
100042	CC	AA	110042		
100043	CC	AA	110043	CC	AA
100044	CT	AG	110044	CC	AG
100045	CC	AA	110045	CC	AA
100046	CC	AA	110046	CC	AA
100047	CC	AA	110047	CC	AA
100049			110049	CC	AG
100050	CC	AA	110050	CC	AA
100051	CC	GG	110051	CC	AG
100052	CC	AA	110052	CC	AG
100053	CC	AG	110053		
100054	CC	AG	110054	CC	AG
100055	CC	AG	110055	CC	AA
100056	CC	AA	110056	CC	AG
100057	CC	AG	110057		
100058	CT	AG	110058	CC	AA
100059			110059	CT	GG
100060	CC	AG	110060	CC	AA
100061			110061	CC	AA
100062	CC	AG	110062	CC	AG
100063	CC	AA	110063	CC	AA
100064	CC	AA	110064	CC	AA
100065	CC	AA	110065	CT	AG
100066	CC	AG	110066	CC	AA
100067	CC	AG	110067	CC	AG
100068	CT	AG	110068	CC	AA
100069	CT	AG	110069	CC	AA
100070	CC	AG	110070	CC	AA
100071	CC	AG	110071	CC	AG
100072	CC	AA	110072	CC	AA
100073	CC	AA	110073	CC	AA
100074	CC	AA	110074	CC	AA

100075	CC	AA	110075	CC	AA
100076	CC	AG	110076	CC	AG
100077	CC	AA	110077	CC	AA
100078	CC	AA	110078	CC	AA
100079	CC	AA	110079	CC	AG
100080	CC	AA	110080	CC	AG
100081	CC	AG	110081	CT	AG
100082	CC	AA	110082	CC	AA
100083	CC	AG	110083	CC	AG
100084	CC	AA	110084	CC	AG
100085	CC	AA	110085	CT	AA
100086	CC	AA	110086		
100087	CC	AA	110087	CC	AA
100088	CC	AA	110088	CT	AG
100089	CC	AA	110089	CT	AG
100090	CC	AA	110090	CC	AA
100091	CC	AA	110091	CC	AA
100092	CC	AA	110092	CC	AG
100093	CC	AA	110093	CC	AA
100094	CC	AG	110094	CC	AG
100095	CC	AA	110095	CC	AA
100096	CC	AA	110096	CC	AA
100097	CC	AA	110097	CC	AA
100098	CC	AA	110098	CC	AA
100099	CC	AA	110099	CC	AA
100100	CC	AG	110100	CC	AA
100101	CC	AA	110101	CC	AA
100102	CC	AG	110102		
100103	CC	AG	110103	CC	AG
100104	CC	GG	110104	CC	AA
100105	CT	GG	110105	CT	AG
100106	CC	AG	110106		
100107	CC	AG	110107		
100108	CC	AG	110108		
100109	CC	AA	110109	CC	AA
100110	CC	AG	110110	CC	AG

100111	CC	AA	110111		
100112			110112	CT	GG
100113	CT	AG	110113	CT	AG
100114	CC	AA	110114		
100115	CC	AA	110115		
100116	CC	AA	110116	CC	AG
100117	CC	AA	110117	CC	AA
100118	CC	AA	110118	CC	AG
100119	CC	GG	110119	CC	AG
100120	CC	AG	110120	CC	AA
100121	CC	AG	110121	CT	GG
100122	CC	AG	110122	CC	AG
100123	CC	AG	110123		
100124	CC	AA	110124	CC	AA
100125	CC	AA	110125	CC	AA
100126	CC	AA	110126	CC	AG
100127	CC	AG	110127	CC	AG
100128	CC	AG	110128	CC	AG
100129	CC	AA	110129		
100130	CT	AG	110130	CT	AG
100131	CT	AG	110131	CC	AA
100132	CC	AG	110132	CC	AA
100133	CT	AG	110133	CT	GG
100134	CC	AA	110134	CC	AG
100135	CC	AG	110135	CC	AG
100136	CT	AG	110136	CC	AG
100137	CC	AG	110137	CT	GG
100138	CC	AA	110138	CC	AA
100139	CC	AG	110139	CT	GG
100140	CC	AG	110140	CC	GG
100141	CC	AA	110141	CC	AA
100142	CT	AG	110142	CT	AG
100143	CT	AG	110143	CT	AG
100144	CC	AG	110144		
100145	CT	AG	110145	CT	GG
100146	CT	GG	110146	CT	AG

100147	CT	AG	110147	CT	GG
100148	CC	AA	110148	CC	AG
100149	CC	AG	110149	CT	AG
100150	CC	AA	110150	CC	AG
100151	CC	AG	110151	CT	AG
100152	CC	AA	110152	CC	AA
100153	CC	AA	110153	CC	AA
100154	CC	AG	110154	CC	AG
100155	CC	AA	110155		
100156	CC	GG	110156	CC	AG
100157	CC	AG	110157	CC	AA
100158	CT	GG	110158	CT	GG
100159	CC	AG	110159	CC	AA
100160	CC	AG	110160	CT	GG
100161	CC	AG	110161	CC	AG
100162	CC	AA	110162	CC	AA
100163	CC	AA	110163		
100164	CC	AG	110164		
100165	CC	AA	110165	CC	AA
100166	CC	AA	110166	CC	AA
100167	CC	AA	110167	CC	AA
100168	CC	AA	110168	CC	AA
100169	CT	AG	110169	CC	AG
100170	CC	AA	110170	CC	AA
100171	CT	AG	110171	CC	AA
100172	CC	AA	110172		
100173	CC	AA	110173	CC	AA
100174	CT	AG	110174		
100175	CT	GG	110175		
100176	CC	AA	110176	CT	AG
100177	CC	GG	110177		
100178	CC	AA	110178	CT	AG
100179	CT	AG	110179	CT	AG
100180	CC	AG	110180	CC	AG
100181	CT	AG	110181	CT	AG
100182	CC	AA	110182	CC	AA

100183	CC	AG	110183	CC	AG
100184	CC	AG	110184		
100185	CC	AA	110185	CC	AG
100186	CC	AA	110186		
100187	CC		110187	CC	AG
100188			110188	CT	AG
100190	CC	AG	110190	CC	AG
100191	CC	AA	110191	CC	AA
100192	CC	AA	110192	CC	AA
100193	CT		110193	CC	AA
100194	CC	AG	110194	CC	AG
100195	CC	AG	110195	CC	AG
100196	CC	AA	110196	CC	AA
100197	CC	GG	110197	CC	GG
100198	CC		110198		
100199	CC	AA	110199	CC	AA
100200	CC		110200	CC	AA
100201	CT		110201	CC	AG
100202	CC	AG	110202	CC	AA
100203	CC	AG	110203		
100205	CC	AG	110205	CC	AG
100206	CT		110206	CT	AG
100207	CC	AA	110207		
100208	CC	AA	110208		
100209	CC	AG	110209	CC	AA
100210	CC	AA	110210	CC	AG
100211	CC		110211	CC	AA
100212	CC	AG	110212		
100213	CC	AG	110213	CC	AA
100214	CC	AG	110214		
100215	CC	AA	110215		
100216	CC	AA	110216		
100217	CC	AG	110217		
100218	CC	AA	110218		
100219	CC	AA	110219	CT	AG
100220	CC	AA	110220		

100221	CC	AG	110221		
100222	CC	AA	110222		
100223	CC	AA	110223		
100224	CT	AG	110224		
100225	CC	AA	110225		
100226	CC	AA	110226	CC	AA
100227	CC	AA	110227		
100228	CC	AG	110228	CC	AA
100229	CC	AG	110229		
100230	CC	AA	110230	CC	AG
100231	CC	AA	110231	CC	AG
100232	CT	GG	110232		
100233	CC	AA	110233	CC	AG
100234	CC	AG	110234		
400070	CC	AA	400126	CT	GG
400073	CC	GG	400131	CT	AG
400074	CC	AA	400132	CC	AA
400075	CT	AG	400133	CT	GG
400076	CC	AG	400135	CC	AG
400077	CT	AG	400136	CC	AA
400078	CC	AG	400137	CC	AG
400085	CC	AA	400138	CC	AA
400089	CC	AG	400140	CC	AA
400090	CC	AA	400141	CC	AA
400091	CC	AG	400143	CC	AG
400093	CC	AG	400144	CC	AA
400096	CT	GG	400145	CC	AG
400097	CC	AG	400146	CC	AG
400098	CC	AG	400147	CC	AG
400098	CC	AG	400148	CC	AG
400099	CC	AA	400149	CC	AA
400100	CC	AG	400150	CC	AA
400101	CT	AG	400151	CT	GG
400103	CC	AA	400155	CT	AG
400104	CC	GG	400156	CC	AA
400105	CC	AG	400157	CC	AA

400106	CC	AA	400158	CT	AG
400107	CC	AA	400159	CC	AG
400108	CC	GG	400160	CC	AG
400109	CC	AG	400161	CT	GG
400110	CC	AA	400162	CC	AG
400111	CC	AA	400165	CC	AG
400112	CC	AG	400166	CC	AA
400113	CC	AG	400167	CC	AA
400114	CT	AG	400168	CC	AG
400115	CC	AA	400171	CC	AA
400116	CC	AA	400172	CC	AA
400117	CC	AG	400175	CC	AA
400121	CC	AA	400177	CC	AG
400122	CT	GG	400179	CC	GG
400123	CC	AA	400180	CC	AA
400124	CC	AG	400181	CC	AA
400182	CC	AA	400241	CC	AA
400185	CT	GG	400242	CC	AA
400186	CC	AG	400248	CT	AG
400187	CC	AA	400250	CC	AA
400188	CT	AG	400251	CC	AA
400189	CC	GG	400252	CT	AG
400190	CC	AA	400253	CT	GG
400191	CT	AG	400254	CC	AA
400192	CC	AA	400255	CT	AG
400193	CC	AA	400256	CT	GG
400194	CC	AG	400259	CT	GG
400195	CT	AG	400260	CC	AA
400196	CC	AG	400261	CC	AA
400198	CC	AA	400262	CC	AA
400199	CT	AG	400263	CC	GG
400200	CC	AA	400267	CC	AG
400201	CC	AA	400268	CC	GG
400206	CT	GG	400269	CC	AG
400207	CC	AA	400270	CC	AA
400208	CC	AA	400271	CC	AA

400209	CC	AA	400273	CC	AG
400210	CC	AA	400274	CC	AA
400211	CC	AA	400275	CC	AG
400212	CC	AA	400276	CC	GG
400213	CC	AA	400277	CC	AG
400214	CC	GG	400280	CC	AA
400215	CC	AA	400281	CC	AA
400221	CC	AA	400282	CT	GG
400222	CC	AG	400283	CC	AG
400226	CC	AG	400284	CT	AG
400228	CC	AA	400285	CC	AG
400229	CT	AG	400286	CC	AA
400230	CT	AA	400287	CC	AA
400231	CC	AG	400289	CC	AA
400232	CC	AA	400292	CC	AA
400233	CT	AG	400293	CT	GG
400235	CC	AA	400294	CC	AG
400237	CT	AG	400295	CC	AG
400238	CC	AG	400296	CC	AG
400239	CC	AA	400297	CC	AA
400240	CT	GG	400298	CC	AA
400299	CC	AA	400395	CC	AA
400300	CC	AA	400396	CT	AG
400301	CC	AG	400397	CC	AG
400302	CT	GG	400399	CC	AA
400303	CC	AG	400400	CC	AA
400304	CC	AG	400401	CC	AG
400305	CC	AG	400402	CC	AA
400306	CC	AA	400403	CC	AG
400307	CC	AA	400404	CC	AA
400308	CC	AG	400405	CC	AA
400309	CC	GG	400406	CC	AA
400310	CC	AA	400407	CC	AG
400311	CC	AA	400408	CC	AA
400312	CC	AA	400409	CC	AA
400313	CC	AG	400410	CC	AG

400314	CC	AG	400411	CC	AG
400315	CC	AA	400412	CC	AA
400316	CT	AG	400413	CC	AA
400317	CC	AA	400414	CC	AG
400318	CC	AG	400415	CC	AA
400319	CC	AG	400416	CC	AA
400320	CC	AG	400417	CC	AA
400321	CC	AG	400418	CC	AA
400322	CC	AG	400419	CC	AA
400323	CC	AG	400420	CC	AA
400324	CC	AG	400421	CC	AA
400325	CC	AG	400422	CC	AG
400326	CC	GG	400423	CC	AA
400327	CC	AG	400424	CC	AA
400328	CC	AG	400425	CC	AA
400329	CC	AA	400427	CC	GG
400330	CC	AG	400428	CC	AA
400333	CC	AA	400429	CC	AA
400334	CC	AG	400430	CC	AA
400335	CC	AG	400431	CC	GG
400336	CC	AA	400432	CC	AG
400338	CC	AA	400433	CC	AA
400339	CC	AA	400434	CC	AA
400340	CC	AG	400435	CC	AG
400391	CC	AG	400436	CC	AA
400392	CC	AG	400437	CT	AG
400438	CT	AG	400483	CC	AA
400439	CC	AA	400484	CC	AA
400440	CC	AG	400486	CT	AG
400441	CT	GG	400487	CC	AA
400442	CC	AA	400488	CT	AA
400443	CC	AG	400489	CC	AA
400444	CC	GG	400490	CC	AA
400445	CC	AA	400491	CC	AA
400446	CC	AG	400492	CC	AA
400447	CC	AA	400493	CC	AA

400448	CC	AA	400494	CC	AA
400449	CC	AA	400495	CT	AG
400450	CC	AA	400496	CC	AA
400451	CC	AG	400497	CC	AA
400452	CC	AG	400499	CC	AG
400453	CT	AG	400500	CC	AA
400454	CC	AA	400501	CC	AA
400455	CT	AG	400502	CC	AG
400456	CC	AA	400503	CC	AG
400457	CT	AG	400504	CC	AA
400458	CT	AG	400505	CC	AG
400459	CC	AA	400506	CC	AG
400460	CC	AA	400507	CC	AA
400461	CC	AA	400508	CT	AG
400463	CT	AG	400513	CC	GG
400466	CC	AG	400514	CT	AG
400467	CC	AA	400515	CC	AA
400468	CC	AG	400516	CC	AG
400470	CC	AA	400517	TT	GG
400471	CC	AG	400518	CC	AA
400472	CT	AA	400521	CC	AG
400473	CT	AG	400522	CC	AG
400474	CC	AG	400523	CT	AG
400475	CC	GG	400524	CC	AG
400476	CT	GG	400526	CC	AA
400477	CC	AA	400528	CC	AG
400478	CC	AA	400529	CC	AG
400479	CC	AA	400530	CC	AG
400480	CC	AG	400532	CC	AA
400481	CC	GG	400534	CC	AG
400482	CC	AA	400547	CC	AA
400548	CC	AG	400590	CT	AG
400550	CC	AA	400591	CT	AG
400551	CC	AG	400592	CC	AA
400552	CC	AG	400593	CT	AG
400553	CC	AG	400594	CC	AG

400554	CT	GG	400595	CT	AG
400555	CC	AG	400596	CC	AG
400556	CC	AA	400597	CT	AG
400557	CC	AA	400598	CC	AA
400558	CT	GG	400599	CC	AA
400559	CC	AA	400600	CT	AG
400560	CC	AA	400601	CC	AG
400561	CC	AA	400602	CC	GG
400562	CC	AG	400603	CC	AG
400563	CC	AG	400604	CC	AA
400564	CT	AG	400605	CC	AA
400565	CC	AA	400606	CC	AA
400566	CC	AG	400607	CC	AA
400567	CC	AA	400608	CC	AG
400568	CC	AA	400609	CC	AA
400569	CT	AG	400610	CT	AG
400570	CC	AG	400611	CC	AA
400571	CC	AA	400612	CT	AG
400572	CC	AA	400613	CC	AG
400573	CC	AA	400614	CC	GG
400574	CC	AG	400615	CC	AG
400575	CC	AG	400616	CC	AA
400576	CT	AG	400617	CC	AA
400577	CC	AG	400618	CC	AG
400578	CT	AG	400619	CT	AG
400579	CC	AG	400620	CC	AG
400580	CC	AA	400621	CT	GG
400581	CC	AG	400622	CC	AA
400582	CC	AA	400623	CC	AA
400583	CC	AA	400624	CC	AG
400584	CC	AG	400625	CC	AA
400585	CT	GG	400626	CC	AG
400586	CC	AA	400627	CC	AG
400587	CC	AG	400628	CC	AA
400588	CT	AG	400629	CT	AG
400589	CC	AG	400630	CC	AA

400631	CT	AG	400645	CC	AA
400632	CC	AG	400646	CT	GG
400633	CC	AG	400647	CC	AG
400634	CC	AA	400648	CC	AG
400635	CC	AA	400649	CC	AG
400636	CC	AG	400650	CC	AA
400637	CC	AA	400651	CC	AA
400638	CC	AA	400652	CT	AG
400639	CC	AA	400653	CC	AG
400640	CC	AG	400654	CC	AA
400641	CC	AG	400655	CC	AA
400642	CC	AG	400656	CT	GG
400644	CC	AA			

Preglednica XXII: *Frekvence genotipov za polimorfizma Ala114Val in Ile105Val.*

	Ala114Val	N	Ile105Val	N
Slovenski novorojenci	CC	351	AA	197
	CT	77	AG	189
	TT	1	GG	43
Hrvaški novorojenci	CC	146	AA	87
	CT	32	AG	75
	TT	1	GG	17
Hrvaške matere	CC	183	AA	102
	CT	28	AG	86
	TT	0	GG	12

Preglednica XXIII: Pregled rezultatov ANOVA in ANCOVA testiranj za statistično neznačilne povezave med polimorfizmi Ala114Val oziroma Ile105Val ter koncentracij Hg^{2+} in MeHg v izbranih bioloških tkivih.

Populacija	Polimorfizem	Odvisna spremenljivka	ANOVA		ANCOVA		
			p	N	Kovariata	p	N
Hrvaške matere	Ala114Val	lnMHg	0,518	209	M(Se+Mn+Zn)	0,908	201
					M(Se+Mn)	0,902	201
					M(Se+Zn)	0,864	201
					M(Zn+Mn)	0,922	201
					MSe	0,867	201
					MZn	0,883	201
					MMn	0,903	201
Hrvaške matere	Ala114Val	lnmilkHg	0,415	111	M(Se+Mn+Zn)	0,337	105
					M(Se+Mn)	0,463	105
					M(Se+Zn)	0,303	105
					M(Zn+Mn)	0,318	105
					MSe	0,376	106
					MZn	0,281	105
					MMn	0,501	105
					milk(Se+Zn+Mn)	0,398	107
					milk(Se+Mn)	0,402	107
					milk(Se+Zn)	0,484	107
					milk(Zn+Mn)	0,343	107
					milkSe	0,437	108
					milkZn	0,504	107
milkMn	0,342	107					
Hrvaške matere	Ala114Val	milkMeHg	0,882	25	milk(Se+Zn+Mn)	0,851	23
					milk(Se+Mn)	0,758	23
					milk(Se+Zn)	0,658	23
					milk(Zn+Mn)	0,786	23
					milkSe	0,555	23
					milkZn	0,574	23

					milMn	0,738	23
Hrvaške matere	rs11378272	lnHHg	0,891	210	M(Se+Mn+Zn)	0,834	202
					M(Se+Mn)	0,779	202
					M(Se+Zn)	0,886	202
					M(Zn+Mn)	0,768	202
					MSe	0,841	202
					MZn	0,858	202
					MMn	0,714	202
Hrvaške matere	Ala114Val	lnCbHg	0,422	195	Cb(Se+Zn+Mn)	0,568	192
					Cb(Se+Mn)	0,516	192
					Cb(Se+Zn)	0,722	192
					Cb(Zn+Mn)	0,627	192
					CbSe	0,717	193
					CbZn	0,759	192
					CbMn	0,575	192
Hrvaške matere	Ala114Val	lnCbMeHg	0,950	44	Cb(Se+Zn+Mn)	0,486	42
					Cb(Se+Mn)	0,631	42
					Cb(Se+Zn)	0,925	42
					Cb(Zn+Mn)	0,538	42
					CbSe	0,927	42
					CbZn	0,908	42
					CbMn	0,486	42
Hrvaške matere	Ile105Val	lnMHg	0,595	198	M(Se+Mn+Zn)	0,553	191
					M(Se+Mn)	0,608	191
					M(Se+Zn)	0,512	191
					M(Zn+Mn)	0,641	191
					MSe	0,452	191
					MZn	0,600	191
					MMn	0,639	191
					M(Se+Mn+Zn)	0,370	40
					M(Se+Mn)	0,381	40

Hrvaške matere	Ile105Val	lnMMeHg	0,993	47	M(Se+Zn)	0,358	40
					M(Zn+Mn)	0,550	40
					MSe	0,333	40
					MZn	0,476	40
					MMn	0,927	40
Hrvaške matere	Ile105Val	milkMeHg	0,550	23	milk(Se+Zn+Mn)	0,537	21
					milk(Se+Mn)	0,593	21
					milk(Se+Zn)	0,518	21
					milk(Zn+Mn)	0,486	21
					milkSe	0,570	21
					milkZn	0,460	21
					milkMn	0,525	21
Hrvaške matere	Ile105Val	lnHHg	0,920	199	M(Se+Mn+Zn)	0,923	192
					M(Se+Mn)	0,930	192
					M(Se+Zn)	0,915	192
					M(Zn+Mn)	0,971	192
					MSe	0,889	192
					MZn	0,962	192
					MMn	0,969	192
Hrvaške matere	Ile105Val	lnCbHg	0,684	184	Cb(Se+Zn+Mn)	0,711	181
					Cb(Se+Mn)	0,760	181
					Cb(Se+Zn)	0,665	181
					Cb(Zn+Mn)	0,814	181
					CbSe	0,686	182
					CbZn	0,789	182
					CbMn	0,822	182
Hrvaške matere	Ile105Val	lnCbMeHg	0,909	42	Cb(Se+Zn+Mn)	0,562	40
					Cb(Se+Mn)	0,839	40
					Cb(Se+Zn)	0,945	40
					Cb(Zn+Mn)	0,368	40
					CbSe	0,988	40

					CbZn	0,875	40
					CbMn	0,602	40
Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	lnMHg	0,346	198	M(Se+Mn+Zn)	0,176	191
					M(Se+Mn)	0,133	191
					M(Se+Zn)	0,164	191
					M(Zn+Mn)	0,311	191
					MSe	0,119	191
					MZn	0,292	191
					MMn	0,315	191
Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	MMeHg	0,631	47	M(Se+Mn+Zn)	0,121	40
					M(Se+Mn)	0,120	40
					M(Se+Zn)	0,115	40
					M(Zn+Mn)	0,294	40
					MSe	0,113	40
					MZn	0,295	40
					MMn	0,552	40
Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	InmilkHg	0,741	107	milk(Se+Zn+Mn)	0,174	103
					milk(Se+Mn)	0,210	103
					milk(Se+Zn)	0,299	103
					milk(Zn+Mn)	0,203	103
					milkSe	0,337	104
					milkZn	0,441	103
					milkMn	0,237	103
Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	MilkMeHg	0,905	23	milk(Se+Zn+Mn)	0,813	21
					milk(Se+Mn)	0,849	21
					milk(Se+Zn)	0,785	21
					milk(Zn+Mn)	0,753	21
					milkSe	0,941	21
					milkZn	0,753	21
					milkMn	0,795	21

Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	lnHHg	0,443	199	M(Se+Mn+Zn)	0,310	192
					M(Se+Mn)	0,230	192
					M(Se+Zn)	0,290	192
					M(Zn+Mn)	0,494	192
					MSe	0,150	192
					MZn	0,465	192
					MMn	0,452	192
Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	lnCbHg	0,418	184	Cb(Se+Zn+Mn)	0,390	181
					Cb(Se+Mn)	0,450	181
					Cb(Se+Zn)	0,564	181
					Cb(Zn+Mn)	0,263	181
					CbSe	0,590	182
					CbZn	0,467	181
					CbMn	0,279	181
Hrvaške matere	Ala114Val + rs169	lnCbMeHg	0,737	42	Cb(Se+Zn+Mn)	0,618	40
					Cb(Se+Mn)	0,756	40
					Cb(Se+Zn)	0,669	40
					Cb(Zn+Mn)	0,437	40
					CbSe	0,695	40
					CbZn	0,735	40
					CbMn	0,554	40
Hrvaške matere + hrvaški novorojenci	Ala114Val	lnCbHg	0,882	158	Cb(Se+Zn+Mn)	0,652	155
					Cb(Se+Mn)	0,702	155
					Cb(Se+Zn)	0,688	155
					Cb(Zn+Mn)	0,940	155
					CbSe	0,719	156
					CbZn	0,876	155
					CbMn	0,947	155
Hrvaške matere + hrvaški	Ala114Val	lnCbMeHg	0,226	36	Cb(Se+Zn+Mn)	0,568	34
					Cb(Se+Mn)	0,497	34
					Cb(Se+Zn)	0,589	34
					Cb(Zn+Mn)	0,281	34

novorojenci					CbSe	0,528	34
					CbZn	0,241	34
					CbMn	0,264	36
Hrvaške matere + novorojenci	Ile105Val	lnCbHg	0,596	148	Cb(Se+Zn+Mn)	0,817	145
					Cb(Se+Mn)	0,919	145
					Cb(Se+Zn)	0,794	145
					Cb(Zn+Mn)	0,601	145
					CbSe	0,867	146
					CbZn	0,609	145
					CbMn	0,744	145
Hrvaške matere in novorojenci	Ile105Val	lnCbMeHg	0,242	34	Cb(Se+Zn+Mn)	0,693	32
					Cb(Se+Mn)	0,427	32
					Cb(Se+Zn)	0,438	32
					Cb(Zn+Mn)	0,384	32
					CbSe	0,426	32
					CbZn	0,271	32
					CbMn	0,219	32
Hrvaški novorojenci	Ala114Val	lnCbHg	0,975	172	Cb(Se+Zn+Mn)	0,995	157
					Cb(Se+Mn)	0,991	157
					Cb(Se+Zn)	0,926	157
					Cb(Zn+Mn)	0,977	157
					CbSe	0,994	170
					CbZn	0,976	157
					CbMn	0,951	157
Hrvaški novorojenci	Ala114Val	lnCbMeHg	0,917	36	Cb(Se+Zn+Mn)	0,995	34
					Cb(Se+Mn)	0,826	34
					Cb(Se+Zn)	0,676	34
					Cb(Zn+Mn)	0,606	34
					CbSe	0,842	34
					CbZn	0,934	34
					CbMn	0,523	34

Slovenski novorojenci	Ala114Val	lnCbHg	0,642	422	Cb(Se+Zn+Mn)	0,986	397
					Cb(Se+Mn)	0,964	397
					Cb(Se+Zn)	0,985	397
					Cb(Zn+Mn)	0,629	397
					CbSe	0,966	397
					CbZn	0,696	397
					CbMn	0,611	397
Slovenski novorojenci	Ala114Val	CbMeHg	0,957	14	Cb(Se+Zn+Mn)	0,715	12
					Cb(Se+Mn)	0,565	12
					Cb(Se+Zn)	0,781	12
					Cb(Zn+Mn)	0,941	12
					CbSe	0,908	12
					CbZn	0,969	12
					CbMn	0,704	12
Hrvaški novorojenci + slovenski novorojenci	Ala114Val	lnCbHg	0,715	594	Cb(Se+Zn+Mn)	0,944	511
					Cb(Se+Mn)	0,940	511
					Cb(Se+Zn)	0,977	555
					Cb(Zn+Mn)	0,671	511
					CbSe	0,979	568
					CbZn	0,722	555
					CbMn	0,652	511
Hrvaški novorojenci + slovenski novorojenci	Ala114Val	lnCbMeHg	0,715	63	Cb(Se+Zn+Mn)	0,821	45
					Cb(Se+Mn)	0,686	45
					Cb(Se+Zn)	0,871	47
					Cb(Zn+Mn)	0,791	45
					CbSe	0,742	47
					CbZn	0,905	47
					CbMn	0,716	45
Hrvaški novorojenci	Ile105Val	lnCbHg	0,293	172	Cb(Se+Zn+Mn)	0,219	157
					Cb(Se+Mn)	0,229	157
					Cb(Se+Zn)	0,162	157
					Cb(Zn+Mn)	0,353	157

					CbSe	0,183	170
					CbZn	0,269	157
					CbMn	0,346	157
Hrvaški novorojenci	Ile105Val	lnCbMeHg	0,867	36	Cb(Se+Zn+Mn)	0,381	34
					Cb(Se+Mn)	0,767	34
					Cb(Se+Zn)	0,899	34
					Cb(Zn+Mn)	0,513	34
					CbSe	0,930	34
					CbZn	0,885	34
					CbMn	0,759	34
Slovenski novorojenci	Ile105Val	lnCbHg	0,214	422	Cb(Se+Zn+Mn)	0,441	397
					Cb(Se+Mn)	0,384	397
					Cb(Se+Zn)	0,445	397
					Cb(Zn+Mn)	0,270	397
					CbSe	0,386	397
					CbZn	0,296	397
					CbMn	0,260	397
Slovenski novorojenci	Ile105Val	CbMeHg	0,454	13	Cb(Se+Zn+Mn)	0,176	12
					Cb(Se+Mn)	0,148	12
					Cb(Se+Zn)	0,539	12
					Cb(Zn+Mn)	0,319	12
					CbSe	0,494	12
					CbZn	0,450	12
					CbMn	0,557	12
Hrvaški novorojenci + slovenski novorojenci	Ile105Val	lnCbHg	0,198	594	Cb(Se+Zn+Mn)	0,563	511
					Cb(Se+Mn)	0,579	511
					Cb(Se+Zn)	0,236	555
					Cb(Zn+Mn)	0,450	511
					CbSe	0,235	568
					CbZn	0,233	555
					CbMn	0,443	511

Hrvaški novorojenci + slovenski novorojenci	Ile105Val	lnCbMeHg	0,815	53	Cb(Se+Zn+Mn)	0,446	45
					Cb(Se+Mn)	0,491	45
					Cb(Se+Zn)	0,614	47
					Cb(Zn+Mn)	0,492	45
					CbSe	0,622	47
					CbZn	0,689	47
					CbMn	0,488	45
Hrvaški novorojenci	Ala114Val + Ile105Val	lnCbMeHg	0,252	36	Cb(Se+Zn+Mn)	0,613	34
					Cb(Se+Mn)	0,519	34
					Cb(Se+Zn)	0,354	34
					Cb(Zn+Mn)	0,466	34
					CbSe	0,332	34
					CbZn	0,274	34
					CbMn	0,486	34
Slovenski novorojenci	Ala114Val + Ile105Val	lnCbHg	0,848	422	Cb(Se+Zn+Mn)	0,938	397
					Cb(Se+Mn)	0,929	397
					Cb(Se+Zn)	0,930	397
					Cb(Zn+Mn)	0,929	397
					CbSe	0,925	397
					CbZn	0,796	397
					CbMn	0,913	397
Slovenski novorojenci	Ala114Val + Ile105Val	CbMeHg	0,814	14	Cb(Se+Zn+Mn)	0,451	12
					Cb(Se+Mn)	0,513	12
					Cb(Se+Zn)	0,828	12
					Cb(Zn+Mn)	0,293	12
					CbSe	0,898	12
					CbZn	0,972	12
					CbMn	0,350	12
Hrvaški novorojenci + slovenski	Ala114Val + Ile105Val	lnCbHg	0,657	594	Cb(Se+Zn+Mn)	0,725	511
					Cb(Se+Mn)	0,655	511
					Cb(Se+Zn)	0,731	555
					Cb(Zn+Mn)	0,458	511

novorojenci					CbSe	0,721	568
					CbZn	0,349	555
					CbMn	0,542	511
Hrvaški novorojenci + slovenski novorojenci	Ala114Val + Ile105Val	lnCbMeHg	0,162	53	Cb(Se+Zn+Mn)	0,521	45
					Cb(Se+Mn)	0,476	45
					Cb(Se+Zn)	0,361	47
					Cb(Zn+Mn)	0,344	45
					CbSe	0,342	47
					CbZn	0,184	47
					CbMn	0,349	45

Preglednica XXIV: Pregled rezultatov ANOVA testov za statistično neznačilne povezave med polimorfizmi Ala114Val oziroma Ile105Val ter koncentracijami ostalih kovin (As, Cu, Zn, Cd, Mn, Pb) v izbranih bioloških tkivih.

Populacija	Polimorfizem	Odvisna spremenljivka	ANOVA	
			p	N
Hrvaške matere	Ala114Val	MZn	0,969	202
		lnMCd	0,562	202
		lnMAs	0,300	202
		MSe	0,560	203
		CbMn	0,574	192
		CbCu	0,171	192
		lnCbZn	0,472	192
		CbSe	0,847	193
		lnCbCd	0,681	192
		lnCbPb	0,184	192
		lnmilkMn	0,145	112
		milkCu	0,805	112
		milkZn	0,699	112
		milkSe	0,680	113
		lnmilkCd	0,434	112
lnmilkPb	0,249	112		

Hrvaške matere	Ile105Val	lnMMn	0,126	192
		MCu	0,568	192
		MZn	0,825	192
		MSe	0,888	193
		lnMCd	0,913	192
		lnMPb	0,827	192
		lnMAs	0,467	192
		CbMn	0,404	181
		CbCu	0,351	181
		lnCbZn	0,618	181
		CbSe	0,969	182
		lnCbCd	0,710	181
		lnCbPb	0,523	181
		lnmilkMn	0,661	107
		milkZn	0,781	107
		milkCu	0,996	107
		milkSe	0,124	108
		lnmilkCd	0,831	107
lnmilkPb	0,964	107		
Hrvaške matere	Ala114Val + Ile105Val	lnMMn	0,196	192
		MCu	0,291	192
		lnMAs	0,375	192
		lnMCd	0,170	192
		MSe	0,164	193
		lnMPb	0,498	192
		CbMn	0,468	181
		CbCu	0,480	181
		lnCbZn	0,399	181
		CbSe	0,405	182
		lnCbCd	0,348	181
		lnCbPb	0,976	181
		lnmilkMn	0,480	107
		milkCu	0,567	107

		milkZn	0,775	107
		milkSe	0,384	108
		lnmilkCd	0,640	107
		lnmilkPb	0,465	107
Hrvaški novorojenci	Ala114Val	CbMn	0,225	157
		CbCu	0,200	157
		lnCbZn	0,171	157
		CbSe	0,882	170
		lnCbCd	0,694	157
		lnCnPb	0,231	157
Hrvaški novorojenci	Ile105Val	CbMn	0,373	157
		CbCu	0,552	157
		lnCbZn	0,926	157
		CbSe	0,673	170
		lnCbCd	0,930	157
		lnCnPb	0,858	157
Hrvaški novorojenci	Ala114Val + Ile105Val	CbMn	0,106	157
		CbCu	0,817	157
		lnCbZn	0,730	157
		CbSe	0,195	170
		lnCbCd	0,186	157
		lnCbPb	0,218	157
Slovenski novorojenci	Ala114Val	lnCbMn	0,402	399
		lnCbCu	0,795	399
		lnCbZn	0,481	399
		lnCbAs	0,702	399
		lnCbCd	0,756	101
		lnCbPb	0,255	399
		lnCbMn	0,917	399
		lnCbCu	0,648	399

Slovenski novorojenci	Ile105Val	lnCbZn	0,816	399
		lnCbAs	0,708	399
		lnCbSe	0,159	399
		lnCbCd	0,693	399
		lnCbPb	0,798	399
Slovenski novorojenci	Ala114Val + Ile105Val	lnCbMn	0,115	399
		lnCbCu	0,583	399
		lnCbZn	0,318	399
		lnCbAs	0,738	384
		lnCbSe	0,478	399
		lnCbCd	0,200	101
		lnCbPb	0,662	399

