

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KOSMAČ

DIPLOMSKA NALOGA

POVEZANOST SPREMEMB V GENU *GPX1* S KONCENTRACIJAMI  
 $Hg^{2+}$  IN MeHg PRI NOSEČNICAH IN PRENATALNO IZPOSTAVLJENIH  
OTROCIH

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KOSMAČ

DIPLOMSKA NALOGA

POVEZANOST SPREMEMB V GENU *GPX1* S KONCENTRACIJAMI  
 $Hg^{2+}$  IN MeHg PRI NOSEČNICAH IN PRENATALNO IZPOSTAVLJENIH  
OTROCIH

ASSOCIATION BETWEEN *GPX1* GENE VARIANTS AND  
CONCENTRATIONS OF  $Hg^{2+}$  AND MeHg IN PREGNANT WOMEN  
AND PRENATALLY EXPOSED CHILDREN

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Vzorci krvi, las, mleka in urina nosečnic ter popkovnična kri so bili odvzeti v Sloveniji (Porodnišnica Ljubljana, UKC Ljubljana) in na Hrvaškem (Klinički bolnički centar, Klinika za ginekologijo in porodništvo, Reka) kot del raziskave evropskega projekta PHIME (Public Health Impact of long-term, low-level Mixed Element Exposure in susceptible population strata), sofinanciranega v 6. okvirnem programu. Meritve koncentracij živega srebra in metil živega srebra ter ostalih toksičnih kovin so bile izmerjene na Institutu Jožefa Stefana.

### Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorici asist. dr. Simoni Jurković Mlakar, mag. farm., za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri delu v laboratoriju ter pri izdelavi diplomske naloge. Najlepša hvala tudi vsem ostalim iz Katedre za biokemijo za pomoč v laboratoriju.

Posebna zahvala gre moji družini, Andražu in bližnjim prijateljem za vso podporo med študijem.

### Izjava

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

Ljubljana, julij 2013

Urška Kosmač

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

Članica diplomske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	iii
ABSTRACT .....	v
SEZNAM OKRAJŠAV .....	vii
1 UVOD.....	1
1.1 Živo srebro in njegovo kroženje v okolju .....	1
1.1.1 Mehanizmi toksičnosti živega srebra .....	2
1.1.1.1 Nefrotoksičnost in ekscitotoksičnost Hg <sup>2+</sup> in MeHg.....	4
1.2 Klinični znaki toksičnosti živega srebra .....	6
1.2.1 Vpliv Hg <sup>2+</sup> in MeHg na nosečnice in prenatalno izpostavljene otroke .....	7
1.3 Oksidativni stres in glutationski antioksidativni sistem v bioloških procesih .....	9
1.3.1 Glutationski antioksidativni sistem .....	10
1.3.1.1 Glutation peroksidaza 1 (GPX1).....	11
2 NAMEN DELA.....	14
3 MATERIALI IN METODE .....	15
3.1 Opis vzorcev .....	15
3.2 Izolacija DNK .....	15
3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	16
3.4 Agarozna gelska elektroforeza.....	19
3.5 Denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC) .....	21
3.6 Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in elektroforeza	
24	
3.8 Statistična analiza podatkov.....	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	28
4.1 Značilnosti preiskovane populacije .....	28
4.2 Analiza polimorfizma PoliAla ((GCG) <sub>5-7</sub> ).....	29
4.3 Analiza polimorfizma Pro198Leu (C>T; rs 1050450) .....	31
4.4 Ocena bioloških vplivov polimorfizmov v genu <i>GPX1</i> .....	33
4.4.1 Povezanost polimorfizma PoliAla s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v krvi,	
laseh, mleku in urinu ter popkovnični krvi v hrvaški populaciji .....	33
4.4.2 Povezanost polimorfizma Pro198Leu s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v	
krvi, laseh, mleku in urinu ter popkovnični krvi v hrvaški populaciji.....	35
4.4.3 Povezanost polimorfizma PoliAla s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v	
popkovnični krvi novorojenčev ter s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> v urinu otrok.....	37

4.4.4	Povezanost polimorfizma Pro198Leu s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v popkovnični krvi novorojencev in s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> v urinu otrok .....	38
4.4.5	Povezanost kombinacije obeh polimorfizmov s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v krvi, laseh in mleku mater .....	38
4.4.6	Povezanost kombinacije polimorfizmov s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v popkovnični krvi pri novorojencih .....	41
4.4.7	Povezanost kombinacij proučevanih polimorfizmov v parih mati - otrok s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v popkovnični krvi .....	43
4.4.8	Haplotska študija pri hrvaških materah in otrocih.....	43
4.4.9	Povezanost razvitosti otroka pri starosti 1,5 leta s koncentracijami Hg <sup>2+</sup> in MeHg v različnih bioloških vzorcih pri hrvaških in slovenskih otrocih .....	47
5	<b>SKLEP</b> .....	51
6	<b>LITERATURA</b> .....	53
7	<b>PRILOGE</b> .....	56

## POVZETEK

### POVEZANOST SPREMEMB V GENU *GPX1* S KONCENTRACIJAMI Hg<sup>2+</sup> IN MeHg PRI NOSEČNICAH IN PRENATALNO IZPOSTAVLJENIH OTROCIH

Živo srebro (Hg<sup>2+</sup>) in metil živo srebro (MeHg) imata različen profil toksičnosti. V telesu se oba vežeta na sulfhidrilne skupine različnih snovi, npr. neencimskih antioksidantov, kot je glutation, ali antioksidantne encime, kot so glutation peroksidaze. Glutation peroksidaze so pomembne pri obrambi celic pred oksidativnim stresom zaradi razgradnje vodikovega peroksidu in nevtralizacije peroksidnih kisikovih zvrsti. Ena od najbolj občutljivih populacij za posledice oksidativnega stresa so nosečnice in otroci, še posebno v pre- in perinatalnem obdobju.

Zaradi omenjene vloge glutation peroksidaz smo v diplomski nalogi žeeli ugotoviti, ali sta polimorfizem PoliAla v eksonu 1 in polimorfizem Pro198Leu (C > T) v eksonu 2 gena za glutation peroksidazo tipa 1 (*GPX1*) povezana s koncentracijami Hg<sup>2+</sup> in MeHg pri nosečnicah in novorojenčkih ter ali sta vpletena v njune nevrotoksične učinke pri otroku. V raziskavo smo vključili 213 hrvaških nosečnic in 179 njihovih otrok ter 432 slovenskih otrok. DNK smo izolirali pri nosečnicah iz venske krvi, pri otrocih pa iz popkovnega tkiva. Za določitev polimorfizma PoliAla smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo (PCR), sledila je elektroforeza in denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC). Genotipizacijo polimorfizma Pro198Leu smo izvedli z analizo polimorfizmov, dolžin restrikcijskih fragmentov in elektroforezo (RFLP), po predhodni PCR. Raziskovalni del smo zaključili s statistično obdelavo podatkov s programom SPSS Statistics 20.0, v katero smo vključili podatke koncentracij Hg<sup>2+</sup> in MeHg v krvi, laseh, mleku in urinu mater ter popkovnični krvi novorojenca. S programom EpiData 3.0 smo po Bayley-III lestvici analizirali oceno razvitosti otroka v starosti 18 mesecev in jih z ostalimi podatki analizirali v programu SPSS Statistics 20.0.

Naši rezultati so pokazali, da nobeden od preučevanih polimorfizmov posamezno ni statistično značilno povezan s koncentracijami Hg<sup>2+</sup> in MeHg v nobenem od proučevanih bioloških vzorcev niti v hrvaški niti v slovenski populaciji. Pri preverjanju povezanosti kombinacije obeh polimorfizmov PoliAla in Pro198Leu pa smo pri hrvaških materah zasledili mejno signifikantno povezanost s koncentracijami MeHg v popkovnični krvi ( $p_{ANOVA} = 0,078$ ;  $N = 38$ ) in mleku ( $p_{ANOVA} = 0,080$ ;  $N = 21$ ). Nižja aktivnost encima *GPX1* je povezana s prisotnostjo alela 6 ali 7 Ala in alelom T. Matere, ki so nosilke teh

dveh alelov, so imele najnižje koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$  v popkovnični krvi, medtem ko so bile njihove koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$  v urinu najvišje. Proučevana kombinacija obeh polimorfizmov pri hrvaških otrocih je pokazala mejno značilno povezanost s koncentracijo  $\text{Hg}^{2+}$  v popkovnični krvi ( $p_{\text{ANOVA}} = 0,055$ ;  $N = 96$ ), ob vključitvi kovariat pa tudi s koncentracijo selena v materini krvi ( $p_{\text{ANCOVA}} = 0,038$ ;  $N = 93$ ) in koncentracijo mangana v popkovnični krvi ( $p_{\text{ANCOVA}} = 0,044$ ;  $N = 91$ ). Pri haplotipski analizi pri hrvaških materah in otrocih smo ugotovili, da se statistično značilno razlikujejo kombinacije haplotipa 6Ala/T in koncentracija Se v mleku ( $p_{\text{ANOVA}} = 0,035$ ;  $N = 103$ ), kombinacija haplotipa 6Ala/C in koncentracija Se v mleku ( $p_{\text{ANOVA}} = 0,05$ ;  $N = 103$ ) ter kombinacija haplotipa 6Ala/T v primerjavi s koncentracijo  $\text{Hg}^{2+}$  v mleku ( $p_{\text{ANOVA}} = 0,027$ ;  $N = 100$ ) le pri hrvaških materah. Na koncu smo ugotovili, da ima vodilni učinek samo prisotnost alela 6Ala, kjer so bile koncentracije Se v mleku najnižje. Po Bayley-III lestvici v oceni razvitosti otroka pri približni starosti 1,5 leta ni bilo zaslediti nobenih signifikantnih povezav s proučevanima polimorfizmoma, ob tem pa smo dokazali neodvisno od genotipov statistično značilno povezano med ocenami kognitivnih sposobnosti otroka in koncentracijami MeHg v materini krvi ( $p_{\text{ANOVA}} = 0,012$ ;  $N = 44$ ) ter med ocenami fine motorike pri otroku in koncentracijami  $\text{Hg}^{2+}$  v mleku ( $p_{\text{ANOVA}} = 0,005$ ;  $N = 95$ ).

Zaključimo lahko, da proučevana polimorfizma verjetno nista pomembno vpletena v nagnjenost k večjim toksičnim učinkom  $\text{Hg}^{2+}$  in MeHg na zarodek pri nizki izpostavljenosti mater v času nosečnosti. Nakazuje se, da bi bile lahko koncentracije Se potencialni posredni označevalec toksičnih vplivov  $\text{Hg}^{2+}$  in MeHg v organizmu.

## ABSTRACT

### ASSOCIATION BETWEEN *GPX1* GENE VARIANTS AND CONCENTRATIONS OF Hg<sup>2+</sup> IN MeHg IN PREGNANT WOMEN AND PRENATALLY EXPOSED CHILDREN

Mercury (Hg<sup>2+</sup>) and methyl mercury (MeHg) both have their own profile of toxicity. In organism, both forms bind to thiol groups (-SH), such as nonenzymatic antioxidant (e.g. glutathione) or enzymatic antioxidant (e.g. glutathione peroxidases). The role of glutathione peroxidases is involvement in the defense of cells against oxidative stress. They catalyze the reduction of hydrogen peroxide and neutralize peroxide oxidative species. One of the most vulnerable populations to the effect of oxidative stress are pregnant women and children, especially in pre- and perinatal period.

Because of the role of glutathione peroxidases, we have tried to estimate if polymorphism PolyAla in exon 1 and polymorphism Pro198Leu (C>T) in exon 2 of gene glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) are associated with concentrations of Hg<sup>2+</sup> and MeHg in pregnant women and newborns, including their neurotoxic impact in children. We had DNA samples of 213 Croatian women and 179 of their children and 432 Slovenian children. The DNA was isolated from pregnant women's venous blood specimens and children's cord tissues. Polymorphism PolyAla was analyzed on denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC), after polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis. Genotypization of polymorphism Pro198Leu was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PCR fragments. We completed our experimental work with the statistical analysis made by software SPSS Statistics 20.0, in which we included concentrations of Hg<sup>2+</sup> and MeHg in maternal blood, hair, milk, urine, and cord blood of newborns. Program EpiData 3.0 helped us to analyze Bayley Scales of Infant Development around 18 months. These results were also included in the statistical analysis. We have discovered that polymorphisms individually have no statistical significant association with concentration of Hg<sup>2+</sup> and MeHg in biological samples, in any population. For the combination of both polymorphisms (PolyAla and Pro198Leu) with Croatian mothers, we discovered marginally statistical significant association with concentration MeHg in cord blood ( $p_{ANOVA}=0,078$ ; N=38) and milk ( $p_{ANOVA}=0,080$ ; N=21). Function analyses indicated that T allele in combination with 6Ala or 7Ala repeats of PolyAla polymorphism decrease the *GPX1* protein activity. Combinations of alleles in mother meant, that she had lower concentrations Hg<sup>2+</sup> in cord blood, while concentrations Hg<sup>2+</sup> in

maternal urine were higher. Combination of both polymorphisms in Croatian children is marginally statistically significant in relation to concentration of  $\text{Hg}^{2+}$  in cord blood ( $p_{\text{ANOVA}}=0,055$ ;  $N=96$ ), including the effect of covariates: selenium concentration in maternal blood ( $p_{\text{ANCOVA}}=0,038$ ;  $N=93$ ) and manganese concentration in cord blood ( $p_{\text{ANCOVA}}=0,044$ ;  $N=91$ ). We also performed haplotype analysis of Croatian population and found statistical significant association in mothers between combination of haplotypes 6Ala/T and selenium concentration in milk ( $p_{\text{ANOVA}}=0,035$ ;  $N=103$ ) or concentration  $\text{Hg}^{2+}$  in milk ( $p_{\text{ANOVA}}=0,027$ ;  $N=100$ ), and also between combination of haplotype 6Ala/C and selenium concentration in milk ( $p_{\text{ANOVA}}=0,005$ ;  $N=103$ ). Furthermore, we concluded that majority of the effect is caused only by 6Ala repeats of PolyAla polymorphisms, where selenium concentrations in milk were decreased. Bayley Scale of Infant Development around the age 1.5 showed no statistically significant association with individual polymorphism or combination of both. We proved statistically significant association between scores of cognitive abilities of a child and concentration of MeHg in maternal blood ( $p_{\text{ANOVA}}=0,012$ ;  $N=44$ ) and between score of fine motoric abilities and concentration of  $\text{Hg}^{2+}$  in milk ( $p_{\text{ANOVA}}=0,005$ ;  $N=95$ ), without genotype dependence.

On the basis of our results we can conclude that both polymorphisms are probably not involved in the predisposition to increased toxicity of  $\text{Hg}^{2+}$  and MeHg in an embryo at low exposures of a mother during the pregnancy. We indicate that selenium concentration could be an indirect potential marker of toxic effects of  $\text{Hg}^{2+}$  and MeHg in our body.

## SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
ANCOVA	analiza kovarianc
ANOVA	analiza varianc
buHg	koncentracija živega srebra v urinu novorojenčka (angl. <i>baby urine</i> )
bp	bazni par
cHg	koncentracija živega srebra v popkovnični krvi (angl. <i>cord</i> )
cMeHg	koncentracija metil živega srebra v popkovnični krvi (angl. <i>cord</i> )
CŽS	centralni živčni sistem
CV-AFS	atomska fluorescenčna sprekrometrija hladnih par (angl. <i>Cold vapour atomic fluorescence spectrometry</i> )
DHPLC	denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>Denaturating High Pressure Liquid Chromatography</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfat
GC-FID	plinska kromatografija s plamensko ionizacijskim detektorjem (angl. <i>Gas chromatography – flame ionisation detector</i> )
GPX1	glutation peroksidaza 1
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
HEB	hematoencefalna bariera
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (angl. <i>Hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i> )
hHg	koncentracija živega srebra v laseh (angl. <i>hair</i> )
hMeHg	koncentracija metil živega srebra v laseh (angl. <i>hair</i> )
HWE	Hardy Weinbergovo načelo (angl. <i>Hardy Weinberg equilibrium</i> )
ITM	indeks telesne mase
matHg	koncentracija živega srebra v krvi mater (angl. <i>maternal</i> )
matMeHg	koncentracija metil živega srebra v krvi mater (angl. <i>maternal</i> )
mlekoHg	koncentracija živega srebra v mleku (angl. <i>milk</i> )
mlekoMeHg	koncentracija metil živega srebra v mleku (angl. <i>milk</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo

RFLP	analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
ROS	reakтивne kisikove spojine
SD	standardna deviacija
Sec	selenocistein
SNP	enonukleotidni polimorfizem (angl. <i>single nucleotid polymorphism</i> )
uHg	koncentracija živega srebra v urinu (angl. <i>urine</i> )
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline (angl. <i>Polyunsaturated fatty acid - PUFA</i> )

## 1. UVOD

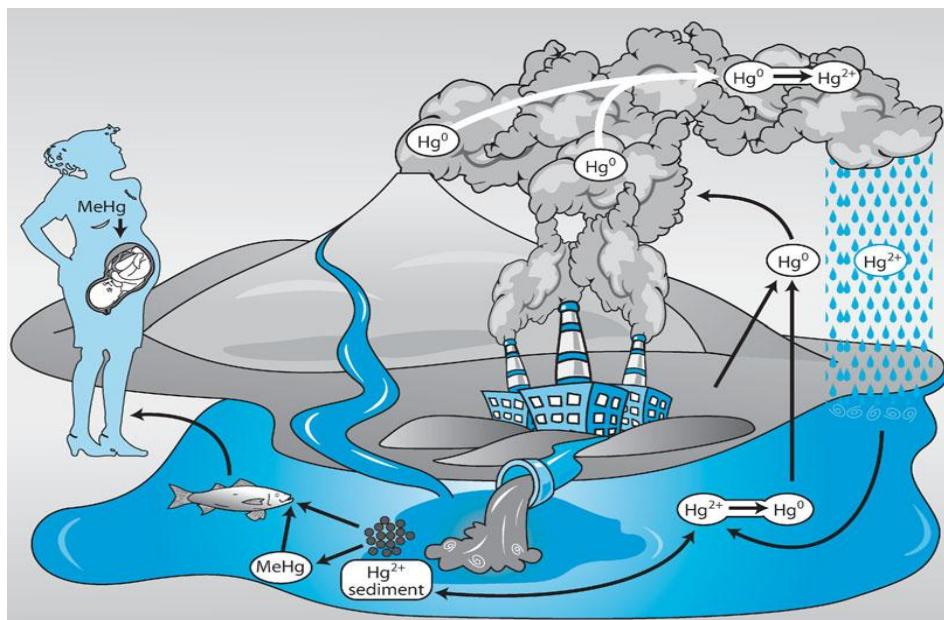
### 1.1. Živo srebro in njegovo kroženje v okolju

Živo srebro vstopa v naravno okolje pri izgorevanju premoga, pri izbruhih vulkanov, z rudarjenjem živega srebra in zlata ter nastaja kot odpadni produkt v kloroalkalni industriji. Uporabljal se je veliko v medicini, zobozdravstveni dejavnosti (amalgamske zalivke), cepivih (kot konzervans), prisoten pa je tudi v termometrih, manometrih, električnih stikalih in drugih napravah (1).

Je zelo toksična kovina s škodljivimi vplivi na človeka. Živo srebro se nahaja v treh kemijskih oblikah: elementarno živo srebro ( $Hg^0$ ), anorgansko ( $Hg^+$ ,  $Hg^{2+}$ ) in organsko živo srebro ( $MeHg$ ). V telesu se razporeja v večino tkiv. Toksični učinki živega srebra lahko povzročijo poškodbe v razvoju možganov. Najbolj izpostavljeni je populacija žensk v rodni dobi, nosečnice ter majhni otroci (2).

Zaradi globalnega kroženja smo ljudje izpostavljeni toksičnosti vseh oblik Hg. V okolju krožijo po naravnih in človeških (antropogenih) poteh.  $Hg^0$  kroži v obliki par, ki izhajajo iz zemlje in vode. V ozračje se izpuščajo tudi pare, nastale pri izgorevanju premoga in delovanju vulkanov. Približno v enem letu se pare v ozračju oksidirajo v topno  $Hg^{2+}$  obliko, ki pade z dežjem spet nazaj na zemeljska tla in v oceane.  $Hg^{2+}$ , ki se ujame v sediment na dnu voda, se pod vplivom mikroorganizmov metilira v bolj toksično obliko,  $MeHg$ . V takšni obliki se začne kopiti v morskih in rečnih ribah ter ostalih morskih sesalcih, ki so del naše prehrane. Z visoko vsebnostjo  $MeHg$  pa so nevarni za ljudi, še posebno za nosečnice in mlajše otroke (3). Sama koncentracija  $MeHg$  je odvisna od vrste, velikosti, navad in starosti rib (4). Celotno globalno kroženje je prikazano na Sliki 1 (3).

$MeHg$  je že v preteklosti povzročal ekološko katastrofo. V petdesetih in šestdesetih letih prejšnjega stoletja je v Minamati in Niigati na Japonskem prišlo do zastrupitev z  $MeHg$  zaradi industrijskega zlivanja odplak z  $MeHg$  v zaliv. V obeh primerih so se ljudje zastrupili z ribami, ki so vsebovale velike koncentracije  $MeHg$ . V Iraku so se ljudje zastrupili s kruhom, kajti uporabljene žitarice so bile škropljene z  $MeHg$  vsebujočim fungicidom (5, 6). V Saudski Arabiji so izvedli študijo o vplivih dentalnih amalgamskih zalivkah na otroke. Amalgamske zalivke vsebujejo 50 %  $Hg^0$  in ostalih toksičnih kovin. Dokazali so, da imajo amalgamski zalivki vpliv na povišano koncentracijo  $Hg^{2+}$  v urinu in laseh (7, 8).



Slika 1: Globalno kroženje živega srebra in izpostavljenost živih organizmov tej kovini (3)

### 1.1.1. Mehanizmi toksičnosti živega srebra

Živo srebro se nahaja v treh kemijskih oblikah: elementarni, anorganski in organski obliki. Metabolizem in porazdeljevanje po organizmu se med oblikami zelo razlikujejo in posledično vplivajo na stopnjo toksičnosti.

- *Elementarno živo srebro ( $Hg^{\circ}$ )*

Če so živi organizmi izpostavljeni vdihovanju par elementarnega živega srebra, se ga po tej poti absorbira kar 80 %. V tekoči obliki ali v obliki hlapov v gastrointestinalnem traktu se ne absorbira dobro.  $Hg^{\circ}$  hitro difundira preko alveolarne membrane v kri in se zaradi dobre lipidotopnosti hitro porazdeljuje po telesu. Prehaja hematoencefalno bariero (HEB) in placento. Ko pride do tkiv, se  $Hg^{\circ}$  oksidira s tkivnimi in eritrocitnimi encimi do dvovalentne oblike  $Hg^{2+}$ . V tej obliki se akumulira v ledvicah in posledično izloča z urinom. Majhen delež  $Hg^{\circ}$  se izloča v izdihanem zraku in z blatom.

- *Anorgansko živo srebro v obliki soli ( $Hg^+$ ,  $Hg^{2+}$ )*

Anorgansko živo srebro pride v stik z našim telesom le z zaužitjem. Absorpcija iz gastrointestinalnega trakta je približno 7–15 %, vendar lahko povzroči takojšne akutne poškodbe prebavnega trakta.  $Hg^{2+}$  ima visoko afiniteto do sulfhidrilnih skupin v rdečih krvnih celicah. Vgrajuje se v ledvice, kjer daljša prisotnost  $Hg^{2+}$  lahko privede do

avtoimunskega glomerulonefritisa. Zanemarljiv je prehod skozi HEB in placente.  $Hg^{2+}$  ima razpolovno dobo 2 meseca in se izloča večinoma z blatom in urinom.

- *Organsko živo srebro (MeHg)*

MeHg se skozi prebavila absorbira v 95 %. Vsa tkiva doseže v 30 urah, kar kaže na dobro lipidotopnost. Hitro prehaja placente in HEB. Veže se na sulfhidrilno skupino cisteina in nastane kompleks MeHg-S-Cys, ki posnema metionin. Preko MeHg-S-Cys kompleksa prehaja HEB v 10 %, s pomočjo aminokislinskih prenašalcev. MeHg se kopiči v laseh, v krvi, vezan na hemoglobin in v mleku. Znano je, da so koncentracije v laseh 250x višje od koncentracij MeHg v krvi. MeHg prehaja tudi v enterohepatično kroženje. Del žolčnega Hg se pod vplivom mikroflore pretvori v  $Hg^{2+}$ . V 90 % se MeHg iz telesa izloča z blatom, s predhodno demetilacijo do  $Hg^{2+}$ . V 10 % se izloča z urinom (3, 4, 9).

Poznavanje mehanizma je ključnega pomena za razumevanje škodljivih bioloških učinkov toksičnih kovin. Na molekularnem nivoju so za vse kemijske oblike Hg dokazani ali predvidevani naslednji mehanizmi (3, 9, 10, 11):

- *membranski transportni mehanizem za endogene snovi in mimikrija:* toksične kovine, med njimi tudi Hg in njegove oblike, se prenašajo v celico z istimi transportnimi mehanizmi kot esencialni elementi. Imajo tudi možnost, da po principu mimikrije zamenjajo esencialne elemente in s tem spreminjačjo biološke učinke tarčnih molekul;
- *interakcije s sulfhidrilnimi skupinami:* visoka afiniteta do sulfhidrilnih skupin (tiolne skupine, -SH) v proteinih in neproteinskih sulfhidrilnih skupinah (metalotioneini) je najpomembnejši mehanizem toksičnosti Hg na biološkem nivoju. Posledično je  $Hg^{2+}$  inhibitor različnih encimov (npr. membranske ATP-aze, katere aktivnost je odvisna od SH skupine). Zlahka reagira tudi z aminsko, fosforo in karboksilno skupino;
- *povečana vsebnost reaktivnih kisikovih zvrsti in zmanjšanje koncentracije glutationa:* zmanjšanje glutationa paralelno poveča količino reaktivnih kisikovih zvrsti. Nadalje izražen oksidativni stres lahko povzroči poškodbe DNK;
- *epigenetski učinki:* Hg toksični učinki se lahko nanašajo na spremembe v izražanju genov, pri čemer DNK zaporedje ostane nespremenjeno. Točen mehanizem ni znan, vendar se domneva, da vezava z SH-skupinami igra pomembno vlogo pri

sekundarnih spremembah DNK in RNK, zaradi konformacijskih sprememb v ribosomalnih proteinih;

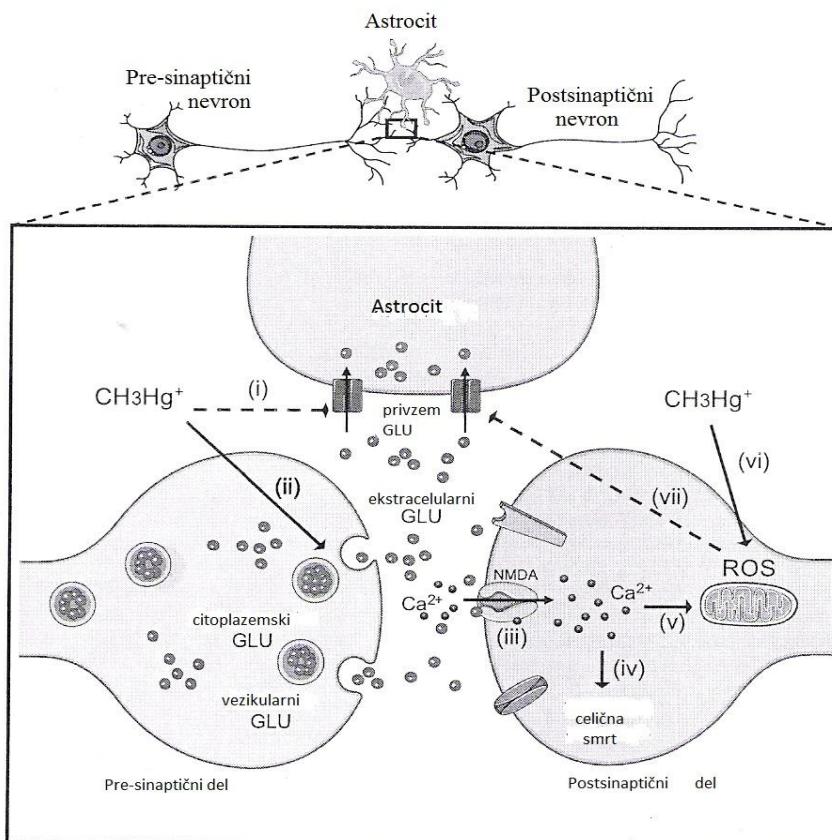
- *interakcije z mikrotubuli:* mikrotubuli igrajo pomembno vlogo v številnih celičnih dogodkih (pri dendritičnem transportu, pri rasti nevronov in diferenciaciji). Vsak monomer tubulina ima vsaj 13 prostih SH skupin. Ko se MeHg ali  $Hg^{2+}$  veže z SH skupino mikrotubula, lahko pride do razgrajevanja mikrotubula, kar povzroča degeneracijo nevronov;
- *mutageni in genotoksični učinki:* kovine so v večini šibko mutagene. V majhni meri delujejo neposredno na genetski material.

#### 1.1.1.1. Nefrotoksičnost in ekscitotoksičnost $Hg^{2+}$ in MeHg

Številne študije so objavile, da so ledvica primarni organ za privzem in kopičenje  $Hg^{2+}$  in MeHg. Kopičenje je povezano s privzemom kovalentno vezanih konjugatov  $Hg^{2+}$  z dvema reduciranimi žveplovima atomoma neke endogene molekule, npr. glutation, cistein, metalotionein, homocistein, albumin v proksimalne tubulne epitelne celice. Vezava  $Hg^{2+}$  s tiolnimi skupinami glutationa (GSH) izčrpa celične signalne poti in povzroča oksidativni stres in lipidno peroksidacijo. Oslabijo tudi drugi antioksidativni zaščitni mehanizmi, kot sta vitamin E in C.

Organsko Hg s kratko alifatsko verigo je najbolj škodljivo in povzroči ireverzibilne poškodbe centralnega živčnega sistema. Najbolj proučevano je MeHg ( $CH_3Hg^+$ ), ki se v jetrih konjugira z GSH do topnih spojin, ki se izločijo v žolč in kri. V črevesu se razgradijo na cisteinski derivat (MeHg-Cys), ki se nadalje transportira. Eksperimenti so podprtli teorijo, da na transport MeHg-Cys preko hematoencefalne bariere (HEB) vplivajo številne L-amino kisline (kot so levcin, izolevcin, metionin, alanin in fenilalanin). Posledično pride do privzema v astrocite v možganih. Vezava  $Hg^{2+}$  na SH skupine GSH in cisteina znižuje vsebnost GSH v astrocitih in zmanjša prenos cisteina v nevrone, ki brez cisteina iz astrocitov ne morejo sintetizirati GSH, to pa povzroča občutljivost nevronov na oksidativni stres. Povišana tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti je posledica motenega privzema glutamata v astrocite, pri čemer so ugotovili, da  $Hg^{2+}$  deluje tudi na druge živčne prenašalce (serotoninergične, dopaminergične, holinergične). MeHg zavira privzem glutamata in serotoninu v astrocite, kar zviša njihovo zunajcelično koncentracijo in povečuje občutljivost sosednjih nevronov za nevrotoksične učinke glutamata, ki lahko vodijo v apoptozo živčevja. Z zaviranjem privzema glutamata pride do pospešenega

vstopanja  $\text{Ca}^{2+}$  v celico in povečanje znotrajcelične koncentracije slednjega vodi v celično smrt in hkrati v nastajanje številnih reaktivnih kisikovih spojin. Natančni procesi v astrocitih so prikazani na Sliki 2. Astrociti lahko varujejo nevrone pred delovanjem Hg s povečano sintezo metalotioneinov, ki vežejo Hg v relativno netoksično obliko (9, 12, 13, 14, 15).



Slika 2: Vpliv MeHg na astrocite (14)

Slika 2 prikazuje tridelno sinapso, kjer MeHg na poti (i) zavira privzem GLU v astrocit in hkrati poveča sproščanje GLU iz pre-sinaptičnega nevrona (ii). To vodi v zvišano koncentracijo zunajceličnega GLU, ki inaktivira receptorje za N-metil D-aspartat (NMDA) (iii). V posinaptičnem nevronu tako pride do vdora  $\text{Ca}^{2+}$  zaradi inaktivacije NMDA receptorjev in lahko vodi v celično smrt (iv). Privzem  $\text{Ca}^{2+}$  v mitohondrije povzroči mitohondrijsko disfunkcijo in poveča ROS. To zadnjo stopnjo MeHg direktno stimulira (vi). Povečana prisotnost ROS (predvsem  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lahko direktno zniža astrocitni privzem GLU (vii). GLU-glutamat; ROS-reakтивne kisikove zvrsti.

## 1.2. Klinični znaki toksičnosti živega srebra

Toksični učinki na organizme so odvisni od načina izpostavljenosti, koncentracije in kemične oblike Hg. Izpostavljenost je ovrednotena s potjo vnosa (prebavila, dihala, koža...) in časom izpostavljenosti (akutna, subakutna, subkronična, kronična) (16). Akutna toksičnost je povezana z inhalacijo par Hg<sup>0</sup> in z zaužitjem Hg<sup>2+</sup>. Sistemski učinki se začnejo po nekaj urah in trajajo do nekaj dni. Izraz kronična toksičnost uporabljamo za daljšo izpostavljenost organskemu Hg (MeHg). Akutna toksičnost zaradi izpostavljenosti visokim odmerkom in kronična toksičnost privedeta do številnih ledvičnih, nevroloških, psiholoških in kožnih sprememb ter drugih kliničnih simptomov, navedenih v Preglednici I (17).

### Preglednica I: Klinični znaki akutne in kronične zastrupitve s Hg (17)

Tarčni sistem	Akutna zastrupitev	Kronična zastrupitev
<b>Kardiovaskularni sistem</b>	Hipertenzija, palpitacije, hipervolemični šok	Hipertenzija, tahikardija
<b>Pljuča</b>	Kratko dihanje, emfizem, pleuralna bolečina, kašelj, cistična fibroza	/
<b>Gastrointestinalni trakt</b>	Navzea, bruhanje, številne abdominalne bolečine, diareja, krv v blatu	Konstipacija, diareja
<b>Centralni živčni sistem</b>	Tremor, razdraženost, zmedenost, zaspanost, konvulzije, psihomotorične in EKG anomalije	Tremor, nespečnost, depresija, glavoboli, ataksija, disartrija, parastezija, vazomotorične motnje
<b>Koža</b>	Stomatitis, sive lise	Gingivitis, akrodinija, alopecija
<b>Jetra</b>	Povišane aminotransferaze, alkalna fosfataza in bilirubin v serumu	/
<b>Ledvica</b>	Oligurija, anurija, hematurija, proteinurija	Poliurija, polidipsija, albuminurija

Tarčni sistem	Akutna zastrupitev	Kronična zastrupitev
<b>Mišično-skeletni sistem</b>	Bolečine v ledvenem predelu	Šibkost mišic, izguba mišičnega tonusa, paraliza
<b>Nosečnost</b>	Spontani splav	Spontan splav, irreverzibilne nevrološke poškodbe pri otroku (paraliza, gluhost ...)
<b>Drugo</b>	Vročina, kovinski okus, močan zadah, izguba zob	Izguba telesne teže, slinjenje, rdečica, fotofobija

Akrodinija, Hunter-Russell-ov sindrom in minamatska bolezen so bolezenska stanja zastrupitve s Hg. Akrodinija ali rožnata bolezen se je pojavljala v preteklosti zlasti pri otrocih, kot rezultat preobčutljivostne reakcije na Hg. Prisotne so bile bolečine v udih, rožnata in luščeca se koža, potenje, izpuščaji in motnje delovanja ožilja. Parastezija, disartrija, možganska ataksija, gluhost in zmanjšana sposobnost akomodacije očesa so skupek simptomov, ki predstavljajo Hunterov - Russellov sindrom. Pridobili so jih s proučevanjem posledic zastrupitve z MeHg pri poklicno izpostavljenih ljudeh. Najbolj znan primer epidemiološke študije zaradi intoksikacije MeHg je Minamata na Japonskem, kjer je odkrite senzorične in motorične motnje predstavljal izraz »Bolezen Minamata« (12, 18).

#### 1.2.1. Vpliv Hg<sup>2+</sup> in MeHg na nosečnice in prenatalno izpostavljene otroke

Placenta ali posteljica predstavlja stičišče med materjo in razvijajočim se plodom. Skozi placento poteka izmenjava snovi s številnimi transportnimi mehanizmi (enostavna difuzija za male molekule, aktivni transport za večje molekule, vendar manjše od 400,000 MM, in pinocitoza za makromolekule). Ti mehanizmi zagotovijo prehajanje snovi, ki so potrebne za razvijajočega se otroka in omejijo prehajanje toksičnih in škodljivih snovi. Placenta ima razvit biotransformacijski sistem, s katerim določenim toksinom onemogoči prehod s pasivno difuzijo (19, 20).

Nosečnicam, doječim materam in otrokom se posebej priporoča uživanje rib. Ribe vsebujejo veliko število proteinov, vitaminov, mineralov, ki so esencialni vir omega 3 maščobnih kislin, ki so pomembne za možganski razvoj. Med drugim omega 3 maščobne kisline, kot so dokozaheksanojska kislina (C22:6), eikozapentaenojska kislina (C20:5) in

dokozapentaenojska kislina (C22:5), veljajo kot zaščita pred razvojem bolezni srca in ožilja (24). Že v poglavju 1.1. smo omenili, da je primarna pot za izpostavljenost MeHg prehrana z ribami. MeHg je lipofilen. Prehaja placente in se kopiči v možganih zarodka. Izloča se tudi v materino mleko. Izpostavljenost visokim koncentracijam MeHg med nosečnostjo lahko povzroči smrt ploda, duševno prizadetost in duševno zaostalost. Kronična izpostavljenost MeHg pri otrocih povzroči resne poškodbe živčnega sistema, prizadetost sluha in govora, ataksijo in motnje vida (4, 21, 22).

Nosečnost je fiziološko stanje povišanega oksidativnega stresa. Z izpostavljenostjo spojinam Hg pa se stopnja oksidativnega stresa še poveča. V telesu se večina glutationa (GSH) poveže s  $Hg^{2+}$ . Tako se izgubi antioksidativna funkcija GSH, izrazitejši pa je učinek nevrotoksičnosti. Pri nagnjenosti k oksidativnemu stresu in zapletom v nosečnosti igrajo pomembno vlogo polimorfizmi v antioksidativnih encimih in nezadostni vnos mikronutrientov, predvsem selena (23). Ribe so tudi pomemben vir selena (Se). Ljudje in živali ga potrebujemo za funkcionalnost številnih od selena odvisnih proteinov (npr. GPX1). Različne študije so ugotovile, da dodatna prisotnost Se v telesu nevtralizira toksične učinke  $Hg^{2+}$  ali MeHg. Selen se poveže s kemijsko obliko Hg in nastane slabo topen ter metabolično inerten kompleks. Ni znano, da bi Se imel zaščitno vlogo pred nevrotoksičnimi učinki Hg oblik (24).

Predhodne študije so pokazale, da organsko in elementarno Hg brez težav prehajata placente in imata podobne učinke na možganski razvoj zarodka. Anorganske oblike nimajo takšnega vpliva. To dejstvo je povečalo zanimanje za zdravje žensk. Leta 2004 sta ameriška okoljska agencija (US EPA) in vladni urad za zdravila in prehrano (US FDA) izdala opozorila za nosečnice, doječe matere in njihove otroke, da se izogibajo določenim vrstam rib, ki naj bi akumulirale previsoke koncentracije Hg.

V Ontario so izvedli tri študije in potrdili statistično značilno povezavo med koncentracijo  $Hg^{2+}$  v laseh in prehrano z ribami. Koncentracija v krvi in laseh sta odlična biomarkerja pri izpostavljenih otrocih. Normalno razmerje vsebnosti  $Hg^{2+}$  med lasmi in krvjo je 190 : 1, medtem ko se pri akutni izpostavljenosti poveča na 370 : 1. Starost nosečnice, telesna teža in višina nimajo statistično značilnega vpliva na vsebnost Hg (25).

Izvajale so se tudi študije na območjih, kjer je prehrana z ribami raznolika. Testirali so vpliv kronične izpostavljenosti nizkim odmerkom MeHg na kognitivne sposobnosti. Rezultati so variirali, posebno pri otrocih, mlajših od 3 let. Enotni rezultati niso bili niti pri povezavi ocen razvitosti otroka po Bayleyju s prenatalno izpostavljenostjo  $Hg^{2+}$  in MeHg (26).

### 1.3. Oksidativni stres in glutationski antioksidativni sistem v bioloških procesih

V študijah so ugotovili, da izpostavljenost anorganskemu in organskemu Hg sproži oksidativni stres, lipidno peroksidacijo in poškodbe DNK (27, 28). Oksidativni stres predstavlja porušeno ravnotežje med tvorbo reaktivnih kisikovih/dušikovih spojin in antioksidativno obrambo, kar vodi do možnih poškodb celic. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) nastajajo pri številnih redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektronov. Vključujejo kisikove radikale in njihove neradikalske intermediate (Preglednica II), ki so v neškodljivih koncentracijah uravnavani s sistemom encimskih in neencimskih antioksidantov (Preglednica III). Na vsak manjši oksidacijski stres celic in tkiv odgovorijo s povišano antioksidativno obrambo. Visoka koncentracija ROS poruši zmogljivost antioksidativne obrambe in povzroči neželene poškodbe bioloških molekul (29).

**Preglednica II: Kisikovi radikali in neradikalski intermediati**

Radikali	Neradikali
Superoksid ( $O_2^-$ )	Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ )
Hidroksil ( $\cdot OH$ )	Hipoklorna kislina( $HClO$ )
Peroksil ( $ROO^\cdot$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoperoksil ( $RO^\cdot$ )	Singletni kisik ( $^1O_2$ )
Hidropoperoksil ( $HOO^\cdot$ )	Peroksinitrit ( $ONOO^-$ )

**Preglednica III: Endogeni encimski in neencimski antioksidanti**

Encimski antioksidanti	Neencimski antioksidanti
Superoksid dismutaza (SOD)	Glutation (GSH)
Glutation peroksidaza (GPX) in glutation reduktaza (GR)	$\alpha$ - tokoferol
Katalaza (CAT)	Bilirubin
Tioredoxin (TRX) in tioredoxin reduktaza (TRXR)	Vitamin C in E

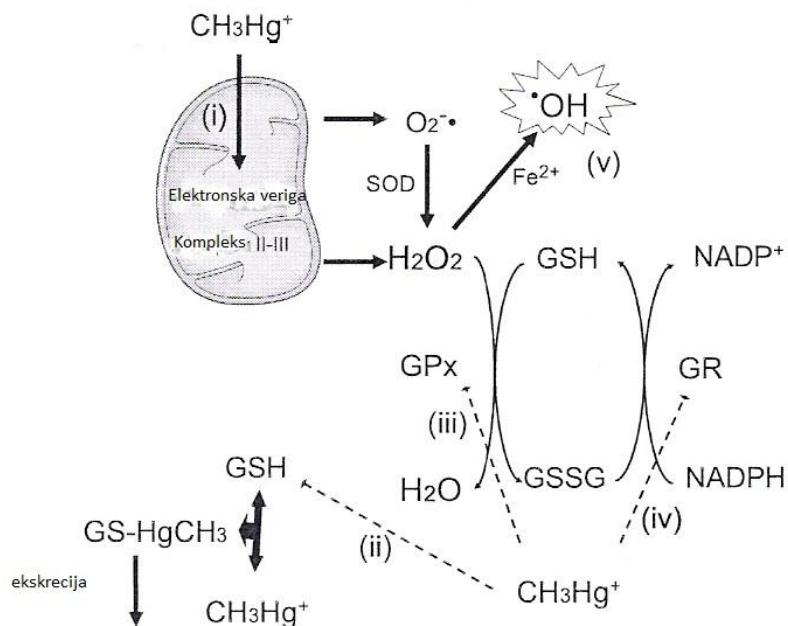
### 1.3.1. Glutationski antioksidativni sistem

Glutationski antioksidativni sistem sestavlja reducirana oblika glutationa (GSH), ki je najpomembnejši nizkomolekularni antioksidant s sulfhidrilno vezjo in encimi glutation reduktaza (GR), glutation S-transferaza (GST) in glutation peroksidaza (GPX) (30). Encim GR ima vlogo vzdrževanja visoke koncentracije reducirajočega GSH v celici, encim GST sodeluje v reakcijah konjugacije ksenobiotikov, medtem ko je encim GPX pomemben za razgradnjo vodikovega peroksida in nevtralizacijo peroksidnih kisikovih zvrsti (31).

GSH je linearni tripeptid L-glutaminske kisline, L-cisteina in glicina (Glu-Cys-Gly) (32). Sintetizira se v vseh celicah, v jetrih pa ga najdemo največ (0,5–10 mM). Cistein ima v svoji strukturi sulfhidrilno skupino, ki je ključna za funkcionalnost GSH. GSH sodeluje pri prenosu aminokislín skozi plazemske membrane in zraven odstranjuje hidroksilne radikale in singletni kisik. S pomočjo katalitičnega selena encima GPX1 pa posredno sodeluje pri reducirjanju hidrogen peroksida. Ima sposobnost regenerirati najpomembnejša antioksidanta, vitamin C in E, nazaj v aktivno obliko.

Toksične kovine so v bioloških sistemih nerazgradljive. Ob vstopu v organizem so fiziološki in toksični učinki regulirani z dvema mehanizmoma: vezavo na specifični ligand (aminokislina, protein, peptid) in izločanjem iz telesa. GSH vsebuje šest potencialnih vezavnih mest. Prevladuje sulfhidrilna skupina cisteina, s katero se povežejo tudi toksične kovine (Hg, kadmij, baker, srebro, arzen in svinec). Reakcija poteka spontano, neencimsko in je reverzibilna. Nastali kompleksi so termodinamsko stabilni. Njihova kinetična stabilnost pa je manjša, kajti kovine se lahko hitro prenašajo med sulfhidrilnimi ligandi. Hiter prenos med sulfhidrilnimi ligandi je eden izmed mehanizmov GSH v sodelovanju z metabolizmom kovin. GSH velja za glavni vir cisteina, ki ima osrednjo vlogo pri homeostazi kovin, je membranski transporter in kofaktor pri redoks reakcijah (31).

Molekulske in celične poti GSH antioksidativnega sistema na izpostavljenost MeHg ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) prikazuje Slika 3 (14).



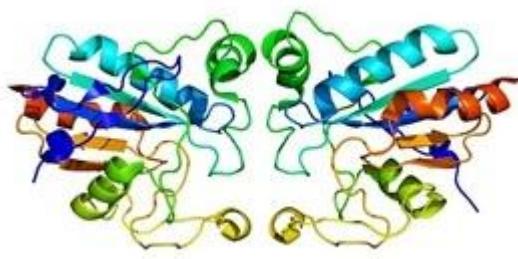
Slika 3: MeHg in GSH antioksidativni sistem (14)

MeHg prekine mitohondrijsko transportno elektronsko verigo (i). To vodi v povečane oblike ROS, kot sta vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in superoksidni anion ( $O_2^-$ ). MeHg reagira z reduciranim GSH, nastane kompleks GS-HgCH<sub>3</sub> (ii) in se izloča iz telesa. Po (iii) in (iv) poti MeHg ovira aktivnost GPX in GR. Vse poti (i–iv) dosežejo višek s povečanim ROS in oksidativnim stresom (v).

#### 1.3.1.1. Glutation peroksidaza 1 (GPX1)

Za GPX je značilno, da imajo antioksidativno funkcijo. Do sedaj je poznanih osem izooblik (GPX1–GPX8), ki imajo različna nahajališča v celicah (33).

GPX1 je homotetramer (Slika 4), sestavljen iz 201 aminokislin in z maso 22 kDa (34, 35). V celici je prisoten v citosolu in mitohondriju, kjer katalizira reakcijo med reduciranim GSH in vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ). Prav tako odstranjuje nizko molekularne hidroperokside (t-butil hidroperoksid), hidroksiperokside maščob in lisofosfatov. Za svoje delovanje potrebuje kovinski ion selen (Se). Njegovo katalitično mesto vsebuje štiri aminokisline: selenocistein (Sec) ali cistein (Cys), glutamin (Gln), triptofan (Trp) in aspartat (Asn). Selenocistein (Sec) zagotavlja hitro reakcijo s hidroperoksiadi in hitro redukcijo v prisotnosti GSH. GPX1 v možganskih mitohondrijih sodeluje z  $\gamma$ -glutamilcisteinom kot reducentom za  $H_2O_2$ , saj se GSH sintetaza tam ne izraža (33).

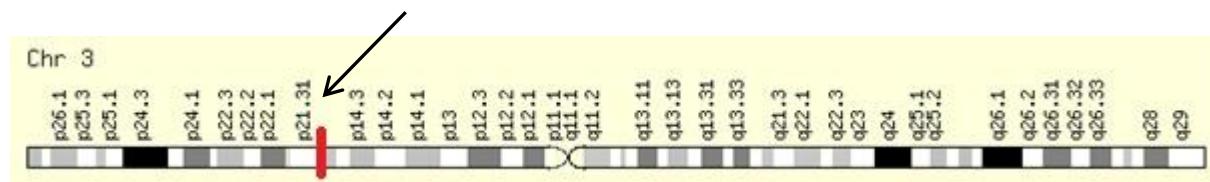


Slika 4: Glutation peroksidaza 1 (GPX1) (34)

Selen je esencialni mikronutrient s pomembno biološko in biokemijsko funkcijo. Predstavlja ključni del albuminov, selenoproteina P (SeP) in ekstracelularne GPX. SeP je edinstven selenoprotein, ki vsebuje številne Sec in Cys. To nakazuje na sposobnost transporta Se in vezave težkih kovin. Selenoproteini igrajo dve pomembni vlogi: vežejo Hg z visokoreaktivnimi selenolnimi skupinami in pomagajo eliminirati ROS, povzročene s Hg. Z meritvami koncentracij Se in  $Hg^{2+}$  v krvi in urinu so ugotovili statistično značilne povezave. Pri ljudeh, ki so bili izpostavljeni visokim koncentracijam  $Hg^{2+}$ , so bile koncentracije Se v serumu statistično značilno višje, medtem ko v urinu ne. Določili so kar dvakrat višje koncentracije Se. Pri visoki vsebnosti Hg se je izkazalo, da se samo z GPX poveča vezava s Se (iz 28,7 na 33 %). Statično značilno se poveča tudi sama aktivnost GPX (36).

Biosinteza GPX1 je podobna biosintezi vseh selenoproteinov, ki so odvisne od količine selenja. Selen se kot selenocistein (Sec) vgradi v aktivno mesto rastoče polipeptidne verige, ki jo kodira UGA. Vgradnja Sec je pomembna, da se UGA prepozna kot kodon za Sec in ne kot stop kodon. Pomanjkanje selenja hitro zaključi podaljševanje verige na UGA kodonu in tako povzroči razgradnjo mRNA selenoproteina (37).

V humanem genomu se gen za GPX1 nahaja na mestu p21.3 kromosoma 3, z dolžino 1,18 kbp. Na Sliki 5 je prikazan s puščico (35).



Slika 5: Gen za GPX1 se nahaja na kromosomu 3 (35)

Na splošno je znanih 38 polimorfizmov na genu *GPX1*. Večina se jih nahaja na 5' nekodirajoči regiji, ki vsebuje promotor gena. Nekodirajoča polimorfizma na poziciji

-602G in +2C znižata promotorsko aktivnost na 90 %, polimorfizma -602G in +2T pa na 75 % aktivnost (38). V naši diplomski nalogi bomo ugotavljali polimorfizme polialaninske regije (PoliAla; GCG) in polimorfizme Pro198Leu (C > T; rs 1050450). PoliAla se nahaja na N-terminalnem delu proteina in vsebuje tri alele s petimi (5 Ala), šestimi (6 Ala) ali sedmimi (7 Ala) ponovitvami alanina (41). Polimorfizem Pro198Leu pomeni, da na kodonu 198 prihaja do substitucije C v T, kar spremeni aminokislino prolin (Pro) v levcin (Leu) (39). PoliAla je trinukleotidni ponavljači se polimorfizem v eksonu 1, Pro198Leu pa je enonukleotidni polimorfizem (SNP) v eksonu 2 (40).

Encim GPX1 povezujejo s stopnjo tveganja za razvoj določenih rakavih obolenj in kardiovaskularnih obolenj. Epidemiološke študije so dokazale, da nizka koncentracija Se korelira z nizko stopnjo tveganja za razvoj raka. Izkazalo se je, da se aleli razlikujejo od populacije do populacije, z njimi pa tudi možnosti različnih predispozicij. Pri kavkazijski in azijski populaciji v ZDA so našli povezano med spolom in genotipom. Moški z genotipom TT (homozigot Leu) so imeli nizko aktivnost GPX1, pri ženskah pa genotip ni imel vpliva. Danska študija je pri kadilcih ugotovila obratno. Ženske z genotipom CC (homozigot Pro) so imele povišano aktivnost GPX1 in nižjo pri homozigotih Leu. Aktivnost rekombinantne oblike GPX1 pri raku dojke je manj odzivna na povečanje koncentracije Se ob prisotnosti alela T (Leu), v primerjavi z aleлом C (Pro) (38). Ugotovljeno je, da je alel 5 Ala statistično značilno povezan z rakom dojke (41). Homozigot 7 Ala ščiti pred osteoporozo. Za heterozigote 6/7 Ala in 5/7 Ala je značilna povišana kostna gostota. Kombinacije polimorfizmov PoliAla in Pro198Leu zmanjšajo aktivnost GPX1. Za 40 % se zmanjša pri kombinaciji 198Leu in 6 Ala (40).

## 2. NAMEN DELA

Glutation peroksidaza 1 (GPX1) je pomemben antioksidantni encim. Njegova aktivnost je spremenjena ob prisotnosti dveh polimorfizmov, ki ju bomo povezali z vplivi Hg<sup>2+</sup> in MeHg na znižano antioksidantno zaščito pred ROS pri nosečnicah in prenatalno izpostavljenih otrocih.

Namen diplomske naloge je ugotoviti morebitno statistično značilno povezanost med polimorfizmom PoliAla in Pro198Leu v genu *GPX1* s koncentracijami Hg<sup>2+</sup> in MeHg, izmerjenimi v krvi, laseh, mleku in urinu nosečnic ter v popkovnični krvi in urinu novorojenčev. Oceno razvitosti otroka pri približno 1,5 letu po Bayley-III lestvici pa bomo povezali z izpostavljenostjo otroka koncentracijam Hg<sup>2+</sup> in MeHg v prenatalnem obdobju.

Diplomska naloga bo razdeljena na tri dele:

- I. z verižno reakcijo s polimerazo bomo pomnožili odsek poli-alaninske regije v genu *GPX1*, preverili uspešnost z agarozno gelsko elektroforezo ter določili genotipe s pomočjo denaturacijske tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (DHPLC).
- II. z verižno reakcijo s polimerazo bomo pomnožili odsek Pro198Leu v genu *GPX1*, preverili uspešnost z agarozno gelsko elektroforezo ter ugotovili genotipe z analizo polimorfizmov dolžin restriktijskih fragmentov, pri čemer bomo uporabili restriktijski encim ApaI in razcepljene odseke ločili z agarozno gelsko elektroforezo.
- III. s statistično obdelavo podatkov bomo preverili povezanost genotipov z učinku Hg<sup>2+</sup> in MeHg na razvoj otroka do starosti 1,5 leta. Z Bayleyjevo oceno pridobljene kognitivne, govorne in motorične sposobnosti otroka bomo skušali te povezati tudi s koncentracijami Hg<sup>2+</sup> in MeHg v krvi, laseh, mleku in urinu pri materah in v popkovnični krvi ter urinu otroka. Statistično značilnim povezavam genotipa s koncentracijami Hg<sup>2+</sup> in MeHg v bioloških vzorcih bomo dodatno preverili možnost sovpliva esencialnih elementov, kot so mangan, cink in selen, ter vpliv okoljskih faktorjev, med katere spadajo starost ob porodu, kajenje, indeks telesne mase (ITM), uživanje rib, količina večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) v krvi in razpoložljivost esencialnega elementa selena v krvi in mleku nosečnic ter v popkovnični krvi.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Opis vzorcev

V raziskavo smo vključili vzorce hrvaške in slovenske populacije nosečnic in otrok, ki sta bili vključeni v projekt PHIME. V skupino hrvaških vzorcev je bilo vključenih 213 vzorcev krvi mater in 179 popkovničnih tkiv otrok. Slovensko skupino vzorcev pa je predstavljalo 432 vzorcev popkovničnih tkiv novorojenčev. Iz krvi mater in popkovničnih tkiv otrok smo izolirali DNK.

V Kliničkem bolničkem centru, na Kliniki za ginekologijo in porodništvo v Reki, so materam iz Hrvaške na kontrolnih pregledih odvzeli vzorce periferne venske krvi in las. Ob rojstvu otrok je bila odvzeta popkovnična kri in popkovnično tkivo. Za nadaljnje analize so vzorce las shranili pri sobni temperaturi, vzorce materine krvi, popkovnične krvi ter popkovničnega tkiva pa na temperaturi -20 °C. Od vseh mater, ki so podale soglasje za vključitev njihovih vzorcev v študijo, so bili pridobljeni še podatki o starosti, kajenju, indeksu telesne mase (ITM) in podatki o uživanju rib. Študija je bila odobrena s strani etične komisije tako v Sloveniji kot na Hrvaškem.

#### 3.2. Izolacija DNK

Genomska DNK mater je bila že izolirana iz levkocitov periferne venske krvi. Pri izolaciji so bili uporabljeni reagenti iz kompleta izdelovalca Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit). Izolirana DNK mater je bila redčena z ultra čisto vodo v razmerju 1 : 20. Genomsko DNK otrok pa smo izolirali iz popkovničnega tkiva, ki je bilo odvzeto ob rojstvu. Izolacija je potekala po protokolu »DNA purification from tissues« (Izolacija DNK iz tkiv) iz priročnika QIAamp DNA Mini and Blood Handbook 04/2010 (42), z uporabo reagentov iz kompleta QIAamp DNA Mini, proizvajalca QIAGEN, ZDA. Zaradi nizkih koncentracij se izolirane DNK otrok ni redčilo. Vse vzorce izoliranih DNK smo hranili na -20 °C za nadaljnjo izvedbo PCR reakcij. S spektrofotometrom NanoDrop 1000 (ZDA) smo izmerili koncentracijo izoliranih DNK pri valovni dolžini 260 nm. Tako smo preverili uspešnost izolacije. Čistost izolirane DNK smo preverili s koeficientom absorpcije pri 260 nm in 280 nm.

### 3.3. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction – PCR) se uporablja *in vitro* za pomnoževanje specifičnega odseka DNK. Za reakcijsko zmes potrebujemo pufer z ustreznim pH in ionsko močjo,  $Mg^{2+}$  ione, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima opredelimo odsek, termostabilno DNK-polimerazo, deoksiribonukleozidtrifosfate - dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ultra čisto vodo in vzorec izolirane DNK. Reakcija poteka ciklično, v treh stopnjah pri različnih temperaturah: denaturacija DNK, prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige s termostabilno DNK-polimerazo. Takšno zaporedje se ponovi 30–40-krat.

- Aparature in pribor
  - avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija)
  - avtoklavorane škatlice s pipetnimi nastavki
  - delovna komora za PCR z UV svetlobo (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner, Latvija)
  - epruvete s pokrovčkom (1,5 ml)
  - polavtomatske pipete (0,1–2,5 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl; Eppendorf, Nemčija)
  - multikanalna pipeta z 12 nastavki (0,5–10 µl; Eppendorf, Nemčija)
  - PCR ploščica s 96 vdolbinicami
  - avtoklavorani plastični pokrovčki
  - centrifuga Mikro-242 (Tehnica, Železniki, Slovenija)
  - klasični PCR – Peqlab (Erlangen, Nemčija)
- Reagenti
  - pufer GeneAmp 10x PCR Gold Buffer Contains no  $MgCl_2$  (25 mM, 1,5 ml; pH 8,0; sestava: 150 mM Tris-HCl in 500 mM KCl; Applied Biosystem, Roche, ZDA)
  - raztopina  $MgCl_2$  (25 mM, 1,5 ml; Applied Biosystem, Roche, ZDA)
  - deoksiribonukleozidtrifosfat- dNTP (10 µl posamezne raztopine dATP, dGTP, dCTP, dTTP koncentracije 100 mM razredčene s 460 µl ultračiste vode)
  - ultra čista voda

- DNK polimeraza (AmpliTaq Gold DNK Polymerase, 5 enot/ $\mu$ l; Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- vzorci izoliranih DNK

Za polimorfizem PoliAla:

- istosmerni začetni nukleotid GPX1nA-F (5  $\mu$ l izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95  $\mu$ l ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)  
5' – GCCGCCGGCCAGTTAAAAGG – 3'
- obratnosmerni začetni nukleotid GPX1nA-R (5  $\mu$ l izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95  $\mu$ l ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)  
5' – AAGTAGTACCTGCCCGCAGG – 3'

Za polimorfizem Pro198Leu:

- istosmerni začetni nukleotid GPX-Ex2.2 – F (5  $\mu$ l izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95  $\mu$ l ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)  
5' – GTTCTAGCTGCCCTTCTCTC – 3'
- obratnosmerni začetni nukleotid GPX-Ex2.2 – R (5  $\mu$ l izhodne koncentracije 100 mM redčene s 95  $\mu$ l ultra čiste vode, proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)  
5' – ACAGGACATACACACAGTTCTG – 3'

- Postopek

Pri pripravi reakcijske zmesi moramo biti zelo pozorni že pri pripravi delovne površine in pri prenašanju reagentov, da se izognemo kakršnikoli kontaminaciji. S 3 % raztopino natrijevega hipoklorita moramo vedno očistiti delovno komoro za PCR, pipete, avtoklavirane škatlice s pipetnimi nastavki, PCR ploščico in steklene vsebnike z epruvetami s pokrovčki, ki jih položimo v komoro. Sledi še 20-minutna sterilizacija pod UV svetljobo. Medtem smo v komoro prinesli vzorce DNK, ki so bili hranjeni na -20 °C, da so se odtalili. Odtalili smo še posamezne reagente, razen DNK-polimeraze. Slednjo smo iz

hladilnika vzeli tik pred uporabo in jo nato takoj vrnili nazaj, sicer bi lahko izgubila aktivnost. Reakcijsko zmes (Preglednica IV, Preglednica V) smo pripravljali v 5- do 100-kratni količini, pri kateri smo upoštevali prebitek zaradi izgub pri delu. V posamezno odprtino na PCR ploščici smo nanesli 19 µl reakcijske zmesi ter dodali še 1 µl vzorčne DNK. Odprtino smo zaprli s plastičnimi pokrovčki in ploščico centrifugirali. Pripravili smo tudi slepi vzorec (negativna kontrola), kamor smo namesto vzorca DNK dodali 1 µl ultra čiste vode.

**Preglednica IV: Priprava reakcijske zmesi za polimorfizem PoliAla**

REAGENT	VOLUMEN (µl)
Pufer	2
Raztopina MgCl <sub>2</sub>	1,2
dNTP	2
GPX1nA - F	1
GPX1nA - R	1
Ultra čista voda	11,7
Taq polimeraza	0,1
Vzorec DNK	1
Končni volumen	20

19 µl

**Preglednica V: Priprava reakcijske zmesi za polimorfizem Pro198Leu**

REAGENT	VOLUMEN (µl)
Pufer	2
Raztopina MgCl <sub>2</sub>	1,2
dNTP	2
GPX-Ex2.2 - F	2
GPX-Ex2.2 - R	2
Ultra čista voda	9,6
Taq polimeraza	0,2
Vzorec DNK	1
Končni volumen	20

19 µl

Tako pripravljeno ploščico (Preglednica IV, Preglednica V) smo vstavili v ciklični pomnoževalnik (naprava PeqLab) in zagnali optimiziran temperaturni program z ustreznimi časovnimi intervali in števili ciklov (Preglednica VI, Preglednica VII).

**Preglednica VI: Optimizirani pogoji za PCR reakcijo za PoliAla**

STOPNJA	TEMPERATURA	ČAS
začetna denaturacija	95 °C	10 min
odvijanje DNK	95 °C	1 min
prileganje začetnih oligonukleotidov	62,5 °C	30 s      38x
podaljševanje verige s polimerazo DNK	72 °C	30 s
končno podaljševanje s polimerazo DNK	72 °C	8 min

**Preglednica VII: Optimizirani pogoji za PCR reakcijo za Pro198Leu**

STOPNJA	TEMPERATURA	ČAS
začetna denaturacija	95 °C	10 min
odvijanje DNK	95 °C	1 min
prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	30 s      35x
podaljševanje verige s polimerazo DNK	72 °C	30 s
končno podaljševanje s polimerazo DNK	72 °C	8 min

### 3.4. Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost pomnoževanja DNK z verižno reakcijo s polimerazo smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, ki temelji na ločevanju nukleinskih kislin na osnovi velikosti. Ločevanje poteka na potovanju negativnih anionov skozi pore gela v električnem polju. Negativno nabita DNA potuje proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Hitrost potovanja je odvisna od velikosti in oblike molekul DNA, od sestave elektroforeznega pufra, jakosti električnega polja, koncentracije agaroznega gela in nanj dodanih interkelirajočih barvil (vgradi se v DNA in pod UV svetlogo fluorescira).

- Aparatura in pribor

- polavtomatska pipeta (2–20 µl, Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipete (10 µl, Saarstadt, Nemčija)
- parafilm
- kadička za elektroforezo (BIO-RAD Wide)
- vir napetosti (BIO-RAD Power Pac Basic, 300 V/400 mA/75 W)
- G-komora za slikanje gela (G-BOX; Syngene, Cambridge, Velika Britanija)
- program GeneSnap in GeneTools za analizo slikanega gela
- erlenmajerica (250 ml) in urno steklo
- merilni valj (100 ml)
- tehnicka (Exacta, Železniki, Slovenija)
- mikrovalovna pečica
- plastična žlička in prijemalka za vročo steklovino
- nosilec za pripravo gela z glavnički
- ultra čista voda

- Reagenti

- agarozza (Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- pufer 1xTAE (Tris acetatni pufer)
- barvilo Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
- nanašalni pufer (ksilencianol (XC) in glicerol)
- označevalec velikosti DNK; fragmenti, velikosti 50, 150 ,300 ,500, 700, 1000 bp  
(PCR Marker G316A, Promega Corp. ZDA)
- vzorci PCR reakcije

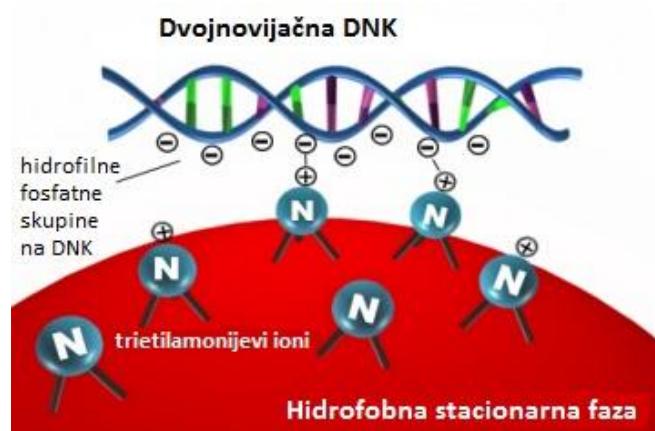
- Postopek

Za pripravo 2 % agarognega gela smo v erlenmajerico dali 1,5 g agaroze in dodali 75 ml 1xTAE, pokrili z urnim stekлом, stehtali in v mikrovalovni pečici pri jakosti 1000 W segrevali do bistre raztopine. Enako smo postopali pri 3 % agarognem gelu, le da smo pri tem dali 2,25 g agaroze. Med segrevanjem smo si pripravili nosilec za pripravo gela in vanj namestili glavničke. Ko se je agarozza popolnoma raztopila, smo z ultračisto vodo

nadomestili izparjeno tekočino do predpisane mase in počakali nekaj minut, da se je raztopina ohladila. V erlenmajerico smo nato dodali še 8 µl Sybr Safe barvila, premešali ter vlili v nosilec. Gel se je ohlajal približno 30 minut, zaščiten z alu folijo pred dnevno svetlobo. Ohlajen gel smo prenesli v elektroforezno kadičko s pufom 1xTAE. Na parafilm smo nanesli 4 µl nanašalnega pufra (ksilencianol in glicerol) in mu dodali 6 µl PCR produkta ter skupaj nanesli na gel. Ksilencianol obarva vzorce, da lahko vizualno spremljamo njihovo potovanje. Glicerol poveča gostoto vzorcev in omogoča lažje usedanje teh v dno luknjice v gelu. Na gel nanesemo še označevalce velikosti DNK fragmentov v razmerju 3 µl PCR Marker : 4 µl ksilencianola ter slepi vzorec. Elektroforezno kadičko z gelom priklopimo za 15 minut na napetost 100 V, potem gel prenesemo v G-BOX in posnamemo sliko pod UV svetlobo. Za detekcijo smo uporabili Sybr Safe, ki ima podoben mehanizem vrivanja kot etidijev bromid, le da je manj toksičen in mutagen.

### 3.5. Denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC)

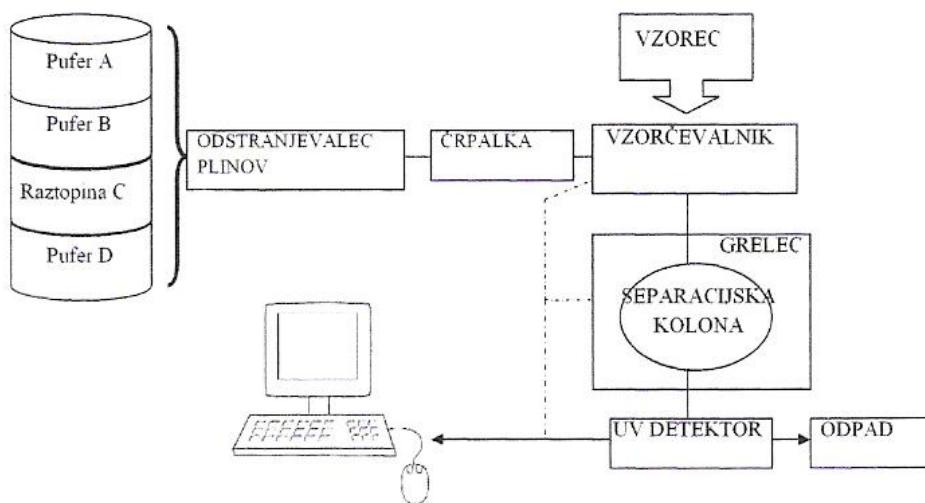
Denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC) temelji na reverznofazni ionsko-izmenjevalni tekočinski kromatografiji. Tehnika je primerna za detekcijo genskih mutacij (dolžin 200–1000 bp) in za detekcijo posameznih enonukleotidnih polimorfizmov (SNPs). Princip ločbe temelji na interakcijah negativno nabitih fragmentov DNK in nepolarne stacionarne faze, ki vsebuje organske katione (Slika 6). Najpogosteje se uporablja organski kation trietylamonijev ion ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}^+$ ) v obliki trietylamonijevega acetata (TEAA). S svojimi pozitivno nabitimi amonijevimi skupinami se veže na DNK, s hidrofobnimi etilnimi skupinami pa na stacionarno fazo.



Slika 6: Princip delovanja DHPLC (43)

DNA Sep kolona predstavlja hidrofobno stacionarno fazo z elektrostatsko nevtralnimi C<sub>18</sub> polistirenskimi-divinilbenzenskimi delci. Polarna mobilna faza je sestavljena iz kombinacije pufrov za eluiranje vzorcev DNK iz kolone (0,1 M TEAA s 25 % acetonitrilom) (43).

Sistem DHPLC je popolnoma avtomatiziran (Slika 7). Povezan je z računalnikom, kjer preko Navigator™ Software nastavimo procesne pogoje in spremljamo celotni potek analize ter na koncu obdelamo rezultate. Naprava je izdelana s strani Transgenomic Wave System® (43). Z DHPLC sistemom smo genotipizirali PoliAla regijo v genu *GPX1*.



**Slika 7: Shematski prikaz aparature DHPLC sistema Wave®**

Za kromatografsko analizo nukleinskih kislin lahko DHPLC uporabimo na 3 načine, ki so odvisni od temperature kolone. Kolona s temperaturo 50 °C predstavlja nedenaturacijski način. DNK fragmenti se ločujejo na podlagi velikosti, in sicer bodo kraši fragmenti eluirani in detektirani hitreje. Delni denaturacijski način, ki smo ga uporabili, se izvaja pri temperaturi kolone med 50–70 °C, z namenom detektirati neznane mutacije ali domnevnih SNPs. Popolna denaturacija je analiza kratkih DNK fragmentov, kot so produkti sintetičnih oligonukleotidov (RNA). Ločijo se na podlagi velikosti in sekvene, pri temperaturi, večji od 70 °C (44).

- Aparatura in pribor
  - škatlice z avtoklaviranimi nastavki za pipete
  - polavtomatska pipeta (2–20 µl; Eppendorf, Nemčija)
  - multikanalna pipeta (0,5–10 µl)
  - mikrotitrská ploščica s 96 vdolbinicami, Micro Amp® optical 96 – Will Reaction Plate (AB Applied Biosystem)
  - avtoklavirani gumijasti pokrovi za mikrotitrské ploščice
  - mikrocentrifuga (FVL-2400N Combi-Spin (Biosan, Latvija))
  - aparatura DHPLC: WAVE® MD System model 4000 Plus, s separacijsko kolono DNASep® in s programsko opremo Navigator™ Software (Transgenomic Inc., Omaha, ZDA)
- Reagenti
  - produkti PCR reakcij
  - Transgenomic Wave® pufer A (0,1 M TEAA; pH 7)
  - Transgenomic Wave® pufer B (75 % 0,1 M TEAA + 25 % acetonitila)
  - Transgenomic Wave® pufer D (25 % vode + 75 % acetonitrila)
  - Transgenomic Wave® raztopina C (96 % vode + 4 % acetonitrila)
- Postopek

Sistem DHPLC je avtomatiziran postopek, vendar smo predhodno preverili ustrezeno namestitev Transgenomic Wave® pufrov. Pufer A je namenjen za vezavo DNK na kolono, pufer B eluira DNK, pufer D spira kolono, raztopina C pa je potrebna za spiranje igle. Nato produkte PCR reakcij, med katerimi je tudi slepi vzorec, prenesemo v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami, ki jih pokrijemo z avtoklaviranim gumijastim pokrovčkom. Tako pripravljeno ploščico namestimo v DHPLC sistem, nastavimo program, identificiramo vsako vdolbinico in zaženemo metodo. Vsak vzorec se analizira posebej po vnaprej določenem zaporedju (Preglednica VIII).

**Preglednica VIII: Potek in trajanje analize ter deleži pufrov na posamezni stopnji programa DHPLC**

STOPNJA ANALIZE	ČAS (min)	DELEŽ PUFRA A (%)	DELEŽ PUFRA B (%)
Injiciranje	0	65	35
Začetek gradienta	1	60	40
Konec gradienta	15,4	39,8	60,2
Začetek čiščenja	15,5	65	35
Konec čiščenja	16	65	35
Začetek ekvilibracije	16,1	65	35
Konec ekvilibracije	16,5	65	35

### 3.6. Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in elektroforeza

Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov je metoda za določanje znanih mutacij ali predvidenih sprememb v DNK s pomočjo restrikcijskih encimov. Restrikcijski encimi prepoznajo določeno zaporedje DNK in ga cepijo. Sprememba nukleotida lahko odstrani ali uvede novo cepitveno mesto. Z metodo smo ugotavljali genotipe polimorfizma Pro198Leu v genu *GPX1*. Uporabili smo restrikcijski encim ApaI, ki prepozna zaporedje na Sliki 8.



Slika 8: Zaporedje, ki ga prepozna restrikcijski encim ApaI

- Aparature in pribor
  - vodna kopel
  - mikrocentrifuga (FVL-2400 N Combi-Spin (Biosan, Latvija))
  - avtoklavirane epruvete s pokrovčkom
  - škatlice s predhodno avtoklaviranimi nastavki
  - polavtomatske pipete (0,1–2,5 µl, 2–20 µl; Eppendorf, Nemčija)

- Reagenti
  - pufer 10x (Restriction Endonuclease Buffer Sa 10x; št: B7531-1VL; Nemčija)
  - restrikcijski encim ApaI (2000U, 10U/ $\mu$ l; št:R4258-2KU; shraniti pri T = -20 °C; pridobljen iz Acetobacter pastorianus; Nemčija)
  - ultra čista voda
  - produkti PCR reakcij gena *GPX1* za polimorfizem Pro198Leu
- Postopek

Reakcijsko zmes smo pripravili po predhodno optimiziranem postopku, ki je prikazan v Preglednici IX. Restrikcijski encim smo vedno vzeli iz zamrzovalnika tik pred uporabo in ga dodajali kot zadnji reagent. Nato smo v vsako epruveto prenesli 14  $\mu$ l reakcijske zmesi in 6  $\mu$ l vzorca, pridobljenega s PCR reakcijo. Zraven smo naredili še slepi vzorec, kjer je PCR produkt nadomeščala ultra čista voda. Vzorce smo centrifugirali in jih čez noč inkubirali na 25 °C na vodni kopeli.

#### Preglednica IX: Priprava reagentov za potek restrikcije

REAGENT	VOLUMEN ( $\mu$ l)
Pufer 10x	2
Encim ApaI	0,07
Ultra čista voda	11,93
PCR produkt	6
Končni volumen	20

Sledilo je analiziranje produktov restrikcije na 3 % agaroznem gelu, ki je predstavljen v poglavju 3.5. Agarozna gelska elektroforeza. Na gel smo vsak vzorec nanesli v razmerju 5  $\mu$ l nanašalnega pufra in 6  $\mu$ l vzorca. Elektroforeza je potekala 30 minut pri napetosti 90 V.

### 3.7. Statistična analiza podatkov

Statistične analize smo izvedli s pomočjo programa SPSS Statistics 20.0. Za pridobljene rezultate in meritve smo najprej izvedli Kolmogorov - Smirnov test, s katerim smo preverili normalno porazdelitev, kot kaže Preglednica X. Če se spremenljivke niso porazdelile normalno, smo preverili še porazdelitev logaritmiziranih vrednosti, če pa kljub temu porazdelitev ni bila normalna (Gaussova), smo uporabili pri statistični analizi posebne neparametrične teste.

**Preglednica X: Statistično značilna meja Kolmogorovega - Smirnovega testa**

Kolmogorov – Smirnov test	
Vrednost $p < 0,05$	Vrednost $p \geq 0,05$
Nenormalno porazdelitev	Normalna porazdelitev

Za nenormalno porazdeljene spremenljivke smo za primerjavo skupin uporabili Kruskalov - Wallisov test, kjer je vrednost  $p \leq 0,05$  pomenila statistično značilno razliko, vrednost  $p > 0,05$  pa, da razlike niso statistično značilne. Normalno porazdeljene spremenljivke smo uporabili v enosmerni ANOVI (analiza varianc). S tem testom se preverja povezanost polimorfizma z normalno ali logaritemsko normalno porazdelitvijo spremenljivk. Razdelili smo jih po principu Preglednice XI.

**Preglednica XI: Statistično značilna meja pri enosmernem ANOVA testu**

Enosmerna ANOVA	
Vrednost $p \leq 0,05$	Vrednost $p > 0,05$
Statistično značilne razlike	Statistično neznačilne razlike

Statistično značilne razlike smo nadalje testirali z analizo kovarianc (ANCOVA), s katero preverjamo povezanost polimorfizma z izbranimi spremenljivkami, ki se normalno ali logaritemsko normalno porazdeljujejo. V Preglednici XII je pokazana delitev rezultatov.

**Preglednica XII: Statistično značilna meja pri testu ANCOVA**

ANCOVA	
Vrednost $p \leq 0,05$	Vrednost $p > 0,05$
Statistično značilne razlike	Statistično neznačilne razlike

S programom EpiData 3.1. smo analizirali ocene razvitosti otroka po Bayley-III lestvici, ki smo jih nadalje pretvorili v numerično obliko s programom Microsoft Office Excel. Sešteli smo ocene in jih vključili v statistično obdelavo s programom SPSS Statistics 20.0.

V populacijski genetiki velja Hardyjevo - Weinbergovo načelo (HWE). To pravi, da sta v neskončni populaciji alelna frekvenca in frekvenca genotipov v ravnotežju in se med generacijami ne spreminja. Načelo predpostavlja, da je parjenje popolnoma naključno, ne prihaja do mutacij in preseljevanja ter ni vplivov naravne selekcije. Za izračun HWE je treba izračunati opazovane alelne frekvence in iz njih pričakovane vrednosti genotipov po naslednjih enačbah:

- $p + q = 1$  ( $p$  ... pogostost alela  $A$ ;  $q$  ... pogostost alela  $a$ )
- $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  ( $p^2$  ... pogostost alela  $AA$ ;  $2pq$  ... pogostost alela  $Aa$ ;  $q^2$  ... pogostost alela  $aa$ )

Iz opazovanih in pričakovanih frekvenc smo s pomočjo Pearsonovega testa chi-kvadrat izračunali  $\chi^2$ . Vrednost nam pove, kako se naši genotipi razlikujejo od genotipov v populaciji HWE. Če je p-vrednost večja od 0,05, pomeni, da je preiskovana populacija v Hardyjevem - Weinbergovem ravnotežju (45).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Značilnosti preiskovane populacije

Preiskovano populacijo je sestavljalo 213 nosečnic iz Hrvaške in 611 otrok iz Hrvaške in Slovenije. Evropski projekt PHIME je v svojo raziskavo vključil nosečnice in otroke iz različnih evropskih držav, tudi Slovenije in Hrvaške. Namen raziskave je bil oceniti vpliv dolgotrajne izpostavljenosti nizkim količinam toksičnih kovin na zdravje nosečnic in otrok. V 7. poglavju, kjer so navedene Priloge, smo s preglednicami sistematično prikazali lastnosti hrvaških nosečnic oziroma mater. Priloga 1 (glej poglavje 7. Priloge) prikazuje starostne skupine, kadilski status, indeks telesne mase (ITM) matere pred nosečnostjo, pogostost uživanja rib, koncentracije različnih vrst VNMK v serumu ter koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v preiskovanih vzorcih. Starostne skupine so razdeljene na tri skupine: < 30 let, 30–35 let in > 35 let. Kadilski status so identificirali kot nekadilka, kadilka, bivša kadilka (kadila je 1–5 let), bivša kadilka (kadila je 6–10 let) in bivša kadilka (kadila več kot 10 let). Glede na ITM pred nosečnostjo pa smo preiskovanke razdelili na podhranjene (< 18,5  $kgm^2$ ), preiskovanke z normalno težo (18,5–24,9  $kgm^2$ ) in s prekomerno težo (> 24,9  $kgm^2$ ).

Priloga 2 (glej poglavje 7. Priloge) prikazuje koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi hrvaških in slovenskih otrok in koncentracijo  $Hg^{2+}$  v urinu hrvaških otrok. Pri hrvaški populaciji otrok smo preverili za prisotnost polimorfizma Pro198Leu, ali se ti genotipi porazdeljujejo skladno s Hardyjevim - Weinbergovim ravnotežjem (HWE). Po enačbi HWE (46) smo izračunali teoretično pričakovane frekvence genotipov, ki jih prikazuje Preglednica XIII.

**Preglednica XIII: Opazovane in pričakovane frekvence genotipov pri polimorfizmu Pro198Leu**

Genotip	Opazovana frekvenca	Pričakovana frekvenca
CC	48	48,09
CT	42	41,82
TT	9	9,09

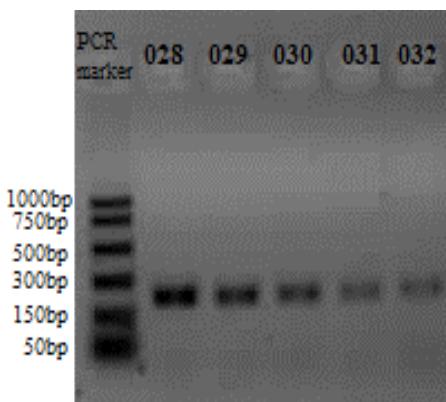
Iz navedenih podatkov smo izračunali naslednje vrednosti:  $\chi^2 = 0,002$ ,  $p_{HWE} = 0,7$  in  $q_{HWE} = 0,3$  ( $p_{HWE}$  pomeni pogostost alela  $A$ ,  $q_{HWE}$  pa pomeni pogostost alela  $a$ ). Eksperimentalna

p-vrednost je 0,999, kar pomeni, da opazovana genotipska frekvenca ni značilno drugačna od teoretične HWE genotipske frekvence. Praktično to pomeni, da naša skupina preiskovancev predstavlja naključen vzorec iz populacije (47).

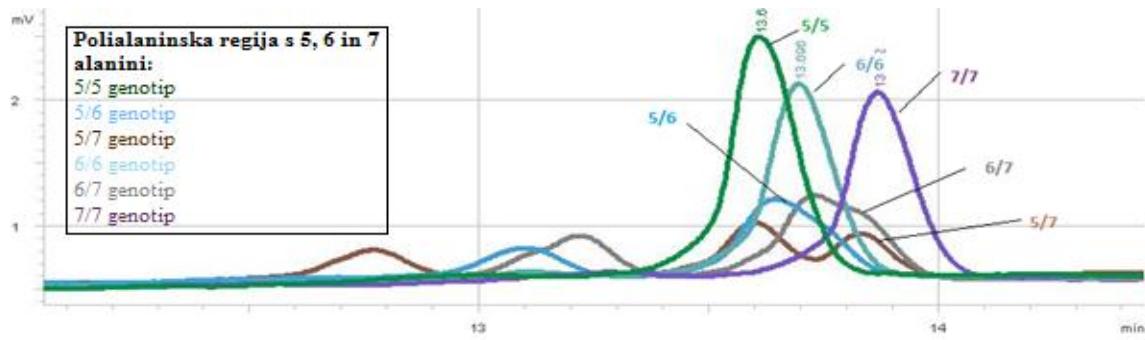
Ovrednotenje nevroloških sposobnosti hrvaških in slovenskih otrok z Bayley-III lestvico je prikazano v Prilogi 3 (glej poglavje 7. Priloge), ki prikazuje starostne skupine otrok in oceno posamezne kategorije Bayley-III testa. Starostne skupine so razdeljene na štiri skupine: < 17 mesecev, 17–18 mesecev, 18–19 mesecev in 19 < mesecev.

#### 4.2. Analiza polimorfizma PoliAla ((GCG)<sub>5-7</sub>)

Polimorfizem PoliAla smo genotipizirali z metodo DHPLC v vseh vzorcih hrvaške in slovenske populacije. Najprej smo pripravili PCR produkte in njihovo uspešnost preverili na 2 % agaroznem gelu. Za genotip 5/5 Ala velja dolžina 209 bp, za genotip 6/6 Ala 212 bp in za genotip 7/7 Ala 215 bp. Lege lis so morale biti znotraj pričakovane dolžine 150 bp in 300 bp PCR markerja, kot prikazuje Slika 9. Genotipe smo določevali na podlagi kromatografskih vrhov z retencijskim časom med 13–16 minut. Za identifikacijo kromatografskih vrhov smo uporabili standard z genotipom 5/7 Ala. Vsak vzorec je bil označen z različno barvo. Rezultat šestih različnih genotipov je prikazan na Sliki 10.

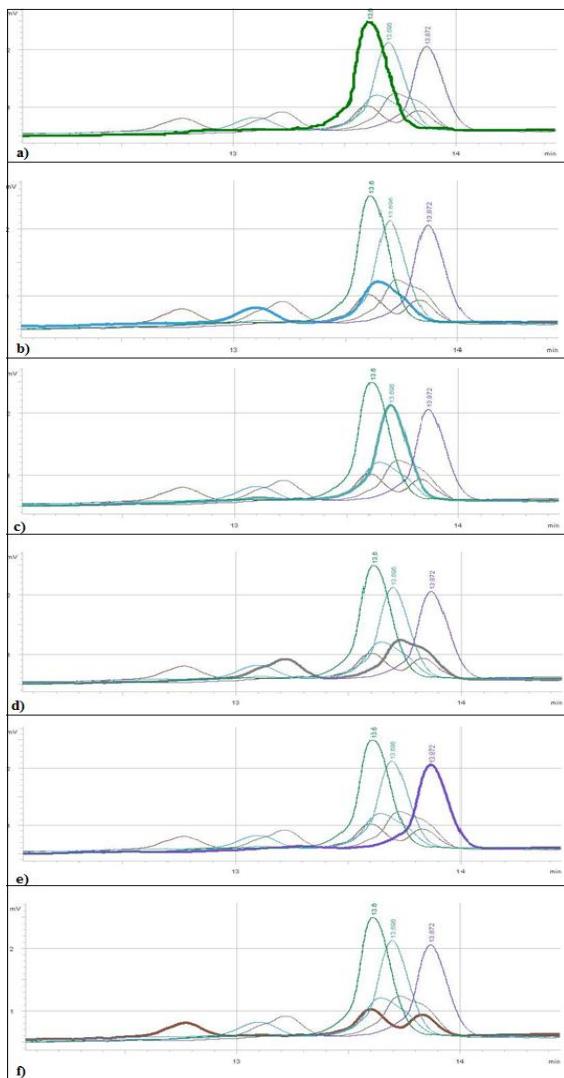


Slika 9: Preverjanje uspešnosti PCR reakcije na 2 % agaroznem gelu. Oznake 028, 029, 030, 031 in 032 so številke vzorcev.



Slika 10: Prikaz DHPLC rezultatov

PoliAla ima tri alele z različnimi ponovitvami tripleta GCG, ki kodira alaninski aminokislinski ostanek v GPX1. Tako dobimo tri homozigote in tri heterozigote, ki so posamično prikazani na Sliki 11.



Slika 11: Primeri genotipov polimorfizma PoliAla: a) homozigot 5/5Ala, b) heterozigot 5/6Ala, c) homozigot 6/6Ala, d) heterozigot 6/7Ala, e) homozigot 7/7Ala, f) heterozigot 5/7Ala

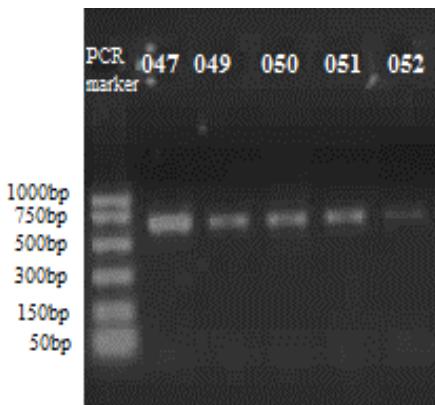
Genotipizacija je bila uspešna pri vseh vzorcih. Na določenem številu vzorcev smo naredili ponovitve in odčitali enake genotipe. S ponovitvami smo preverili natančnost metode DHPLC. Rezultati hrvaških mater in otrok so zbrani v Prilogi 4, rezultati slovenskih otrok pa v Prilogi 5 (glej poglavje 7. Priloge).

Pri hrvaški populaciji smo imeli vzorce mater in njihovih otrok. Pri vzorcih 100082, 100138, 100159 in 100194 se genotipi med materami in otroki niso ujemali v nobenem alelu. Tako je pri vzorcu 100082 imela mama genotip 5/5 Ala, otrok pa 7/7Ala. Pomislili smo, da gre za eksperimentalno napako (napako DHPLC metode), vendar smo jo izključili s trikratno ponovitvijo analize. Vsakič smo pripravili tudi nov PCR produkt in tako izključili še možnost napačnega pomnoževanja s Taq polimerazo. Lahko bi šlo za oploditve z biomedicinsko pomočjo z darovanimi jajčnimi celicami.

Za nadaljnjo statistično obdelavo smo genotipom dodelili naslednje vrednosti: 0 genotipu 5/5 Ala, 1 genotipu 5/6 Ala, 2 genotipu 5/7 Ala, 3 genotipu 6/6 Ala, 4 genotipu 6/7 Ala in 5 genotipu 7/7 Ala.

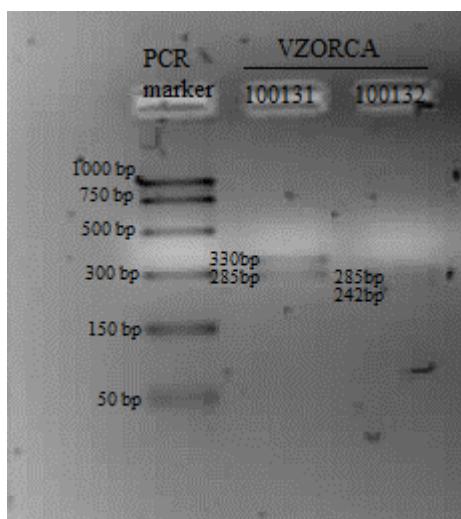
#### 4.3. Analiza polimorfizma Pro198Leu (C > T; rs 1050450)

Genotipe smo določili z analizo PCR-RFLP, in sicer glede na dolžino cepljenih fragmentov po encimski restrikciji. Z agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili, da so vse PCR reakcije uspešno potekle. Uporabili smo 2 % agarozni gel, s katerim smo določili dolžino pomnožene sekvene 615 bp. Lise so bile vidne znotraj 750 bp in 500 bp PCR markerja. Rezultat je viden na Sliki 12. Za analizo RFLP je bil uporabljen 3 % agarozni gel. Če je prišlo do cepitve z encimom ApaI le na istem mestu kodona na obeh alelih, smo dobili dve lisi z dolzinama 285 bp in 242 bp ter označili tak genotip kot genotip TT. Pri homozigotih CC poteče cepitev z encimom ApaI na dveh mestih na obeh alelih in smo zato dobili tri lise z dolzinami 330 bp, 285 bp in 88 bp. V primeru heterozigota CT je na enem od alelov v molekuli DNK prisotno eno mesto cepitve, značilno za genotip TT, na drugem alelu pa sta bili prisotni dve restrikcijski mesti značilni za genotip CC. Tako smo v primeru heterozigotne osebe po restrikciji z ApaI dobili štiri lise dolžin 330 bp, 285 bp, 242 bp in 88 bp. Manjši odsek z dolžino 88 bp se pri heterozigotu in nemutiranem homozigotu na elektroforezni sliki ne opazi zaradi nižje koncentracije produkta, kar doprinese krajsa dolžina tega odseka.



**Slika 12:** Preverjanje uspešnosti PCR reakcije na 2 % agaroznem gelu. Oznake 047, 049, 050, 051 in 052 so številke vzorcev.

Pri RFLP analizi smo imeli težave. Uspešno smo določili 182 genotipov hrvaških mater in 102 genotipa hrvaških otrok (Priloga 4 v 7. poglavju). Slovenskih otrok nismo genotipizirali. Težava je bila, da pri določenih vzorcih nismo mogli zagotovo potrditi genotipa CT in TT zaradi slabe ločljivosti rezultatov. Kljub slabim ločljivostim pa smo lahko potrdili, da je restrikcija v celoti potekla, saj ni bilo prisotne dodatne lise med 750 bp in 650 bp PCR markerja. Na Sliki 13 sta prikazana genotipa CC in TT. RFLP analizo smo večkrat ponovili in poskušali optimizirati pogoje. Uporabili smo drug nanašalni pufer (Loader buffer: ksilencianol + bromfenol), zamenjali kelirajoče barvilo (Sybr Safe smo zamenjali za Midori Green) in elektroforezo izvajali na hladnem (na ledu). Poskusi so bili neuspešni, saj je bila ločljivost še vedno neuspešna. V analizo smo vključili le vzorce, ki smo jih lahko zagotovo ustrezno odčitali. Naključnost vzorcev v populaciji smo preverili s HWE ravnotežjem (glej poglavje 4.1.).



**Slika 13:** Prikaz cepljenih fragmentov po metodi RFLP na 3 % agaroznem gelu (vzorec 100031 prikazuje genotip TT, vzorec 100132 pa genotip CC)

#### 4.4. Ocena bioloških vplivov polimorfizmov v genu *GPX1*

##### 4.4.1. Povezanost polimorfizma PoliAla s koncentracijami $Hg^{2+}$ in MeHg v krvi, laseh, mleku in urinu ter popkovnični krvi v hrvaški populaciji

Število alaninov v PoliAla regiji v eksonu 1 gena *GPX1* se pri ljudeh pojavlja v različnih ponovitvah. Lahko se ponovi petkrat, šestkrat ali sedemkrat. Tako dobimo šest različnih genotipov. Preverili smo, če obstajajo statistično značilne razlike med koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih med temi šestimi genotipskimi skupinami. Meritve koncentracij  $Hg^{2+}$  so bile izvedene po navodilih proizvajalca naprave Direct Mercury Analyzer (Milestone Srl, Italija). Koncentracije MeHg v krvi mater (matMeHg) in popkovnični krvi (cMeHg) so bile določene z metodo atomske fluorescenčne spektrometrije hladnih par (CV-AFS) na napravi Brooks Rand Labs (Model I), ZDA, koncentracije MeHg v laseh (hMeHg) pa po navodilih proizvajalca naprave GC-EDC, HP 5890, Hewlett Packard, ZDA. Vse meritve so izvedli na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani (48). Biološke vzorce smo testirali po postopku, napisanem v poglavju 3.8. Statistična analiza podatkov.

Postavili smo si hipotezi:

$H_0$ : Koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v krvi, laseh, mleku in urinu hrvaških mater ter popkovnični krvi se ne razlikujejo med PoliAla genotipskimi podskupinami.

$H_1$ : Koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v krvi, laseh, mleku in urinu hrvaških mater ter popkovnični krvi se med PoliAla genotipskimi skupinami razlikujejo.

Koncentracije MeHg v krvi in mleku so se porazdeljevale normalno, ostale vrednosti pa so se porazdeljevale logaritemsko normalno (koncentracije  $Hg^{2+}$  v krvi, laseh in mleku mater ter popkovnični krvi in koncentracije MeHg v laseh mater ter popkovnični krvi).  $Hg^{2+}$  v urinu ne ustreza merilom za normalno ali logaritemsko normalno porazdelitev, zato smo uporabili neparametrični Kruskallov - Wallisov test. Z enosmernim ANOVA testom smo preverili povezanost med genotipi in koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih. Rezultati enosmernega testa ANOVA so prikazani v Preglednici XIV.

**Preglednica XIV: Povezanost polimorfizma PoliAla s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih pri hrvaški populaciji**

CRO matere	Povprečne koncentracije posameznih genotipov (ng/g)						Enosmerna ANOVA	
	5/5Ala	5/6Ala	5/7Ala	6/6Ala	6/7Ala	7/7Ala	p	N
matHg	2,60	2,89	2,80	2,34	3,33	2,76	0,536	212
matMeHg	4,38	5,39	5,95	4,62	4,22	4,42	0,916	49
hHg	735,86	910,11	843,4	727,00	1145,8	737,27	0,529	213
hMeHg	1623,40	2403,43	2200,85	1781,00	1927,20	1164,50	0,668	44
cHg	4,33	4,49	4,41	3,63	4,40	4,30	0,671	197
cMeHg	7,25	10,23	10,60	7,73	6,77	8,17	0,377	44
mlekoHg	0,33	0,26	0,30	0,20	0,20	0,18	0,945	113
mlekoMeHg	1,00	0,22	0,14	0,11	0,20	0,16	0,563	25
uHg*	1,17	0,83	0,96	0,66	1,84	0,84	0,630	210

Legenda:

matHg in matMeHg: koncentracije v materini krvi

hHg in hMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v laseh

cHg in cMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

mlekoHg in mlekoMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v mleku

uHg: koncentracija  $Hg^{2+}$  v materinem urinu

N = število vzorcev

\*Uporabili Kruskalov - Wallisov test

Iz Preglednice XIV je razvidno, da lahko v vseh primerih ovržemo alternativno hipotezo ( $H_1$ ), kajti nobena vrednost ne ustreza merilu  $p \leq 0,05$ . Zaključimo lahko, da polimorfizem PoliAla v genu *GPX1* pri hrvaških materah nima statistično značilnega vpliva na koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v krvi, laseh, mleku, niti ni povezan s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v urinu in popkovnični krvi novorojenca.

4.4.2. Povezanost polimorfizma Pro198Leu s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v krvi, laseh, mleku in urinu ter popkovnični krvi v hrvaški populaciji

Enako kot pri prvem polimorfizmu smo ocenjevali biološki vpliv koncentracij  $Hg^{2+}$  in MeHg na genotipe polimorfizma Pro198Leu.

Oblikovali smo ničelno in alternativno hipotezo:

$H_0$ : Koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v krvi, laseh in mleku hrvaških mater ter v popkovnični krvi se ne razlikujejo med Pro198Leu - genotipskimi podskupinami.

$H_1$ : Koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v krvi, laseh in mleku hrvaških mater ter v popkovnični krvi se razlikujejo med Pro198Leu - genotipskimi podskupinami.

V Preglednici XV so prikazani rezultati enosmernega ANOVA testa. Koncentracija  $Hg^{2+}$  v urinu je rezultat Kruskalovega - Wallisovega testa. Med genotipi in koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih ni nobene statistično značilne razlike.

**Preglednica XV: Rezultati polimorfizma Pro198Leu pri hrvaških materah s testom ANOVA**

CRO matere	Povprečne koncentracije posameznih genotipov (ng/g)			Enosmerna ANOVA	
	CC	CT	TT	P	N
matHg	2,62	2,93	3,12	0,848	181
matMeHg	4,75	5,58	6,65	0,501	43
hHg	797,57	854,23	957,96	0,941	182
hMeHg	1807,45	2364,83	2338,29	0,526	39
cHg	4,08	4,49	5,22	0,756	170
cMeHg	8,25	10,69	11,29	0,665	38
mlekoHg	0,28	0,24	0,31	0,755	101
mlekoMeHg	0,19	0,18	0,12	0,669	21
uHg*	0,84	0,71	1,19	0,062	181

Legenda:

matHg in matMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v materini krvi

hHg in hMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v laseh

cHg in cMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

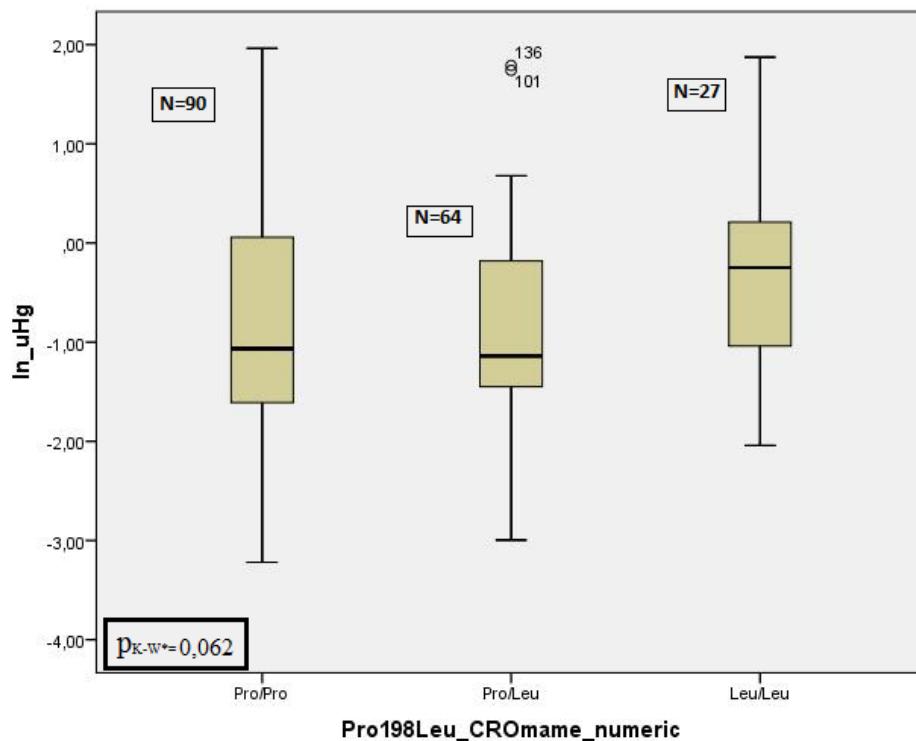
mlekoHg in mlekoMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v mleku

uHg: koncentracija  $Hg^{2+}$  v materinem urinu

N = število vzorcev

\*Uporabili Kruskalov - Wallisov test

Koncentracija  $\text{Hg}^{2+}$  v urinu se je med genotipi mejno statistično značilno razlikovala, zato smo rezultate predstavili še grafično z metodo BoxPlot (»škatla z ročaji«). Grafičen prikaz je na Sliki 14.



Slika 14: Prikaz logaritmiranih koncentracij  $\text{Hg}^{2+}$  v urinu glede na genotip hrvaških mater ter p-vrednost Kruskalovega - Wallisovega testa ( $K - W^*$ ) ( $N = \text{število genotipov}$ )

Iz grafičnega prikaza je razvidno, da imajo matere z genotipom TT (Leu/Leu) najvišje koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$  v urinu. To pomeni, da  $\text{Hg}^{2+}$  v organizmu interagira z večino reduciranega GSH, ki je še na voljo. Zaradi prisotnosti genotipa TT je zmanjšana aktivnost encima GPX1, kar privede do slabše oksidacije reduciranega GSH in posledično kopičenja  $\text{H}_2\text{O}_2$  v organizmu.  $\text{Hg}^{2+}$ , vezan na GSH, se tako v večji meri izloča z urinom. Genotipa CC (Pro/Pro) in CT (Pro/Leu) sta pogosteje prisotna v populaciji, v primerjavi s TT. Pri genotipu CC in CT so povprečne koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$  v urinu primerljive.

Če povzamemo, genotipi polimorfizma Pro198Leu nimajo vpliva na koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih.

#### 4.4.3. Povezanost polimorfizma PoliAla s koncentracijami $Hg^{2+}$ in MeHg v popkovnični krvi novorojenčev ter s koncentracijami $Hg^{2+}$ v urinu otrok

Preverjali smo, če obstaja statistično značilna povezava med genotipi PoliAla in koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi ter koncentracijami  $Hg^{2+}$  v urinu v populaciji hrvaških novorojenčev in otrok. Pri slovenskih otrocih smo genotipe preverjali le s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi, saj urinski vzorci niso bili dosegljivi. Za pridobitev večjega števila vzorcev smo obe populaciji na koncu še združili ter preverili možno povezanost koncentracij  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi z genotipi. Rezultati enosmerne ANOVA so zapisani v Preglednici XVI. Koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi se pri hrvaških otrocih in združeni populaciji porazdeljujejo logaritemsko normalno, kot tudi koncentracije  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi slovenskih otrok. Koncentracija  $Hg^{2+}$  v urinu je rezultat Kruskalovega - Wallisovega testa.

**Preglednica XVI: Rezultati polimorfizma PoliAla pri hrvaških in slovenskih otrocih s testom ANOVA**

PoliAla	<i>Povprečne koncentracije posameznih genotipov</i> (ng/g)						Enosmerna ANOVA		
	<i>CRO</i> otroci	5/5Ala	5/6Ala	5/7Ala	6/6Ala	6/7Ala	7/7Ala	p	N
cHg	6,57	4,54	3,70	3,02	3,85	3,38	0,284	172	
cMeHg	13,37	10,11	5,67	/	8,32	6,67	0,243	38	
buHg*	0,42	0,30	0,57	0,19	0,29	0,27	0,770	102	
<i>SLO</i> otroci		5/5Ala	5/6Ala	5/7Ala	6/6Ala	6/7Ala	7/7Ala	p	N
cHg	2,16	2,11	1,90	1,56	2,09	1,78	0,639	425	
cMeHg	8,18	7,00	6,18	5,57	7,09	3,04	0,836	14	
<i>CRO&amp;SLO</i> otroci		5/5Ala	5/6Ala	5/7Ala	6/6Ala	6/7Ala	7/7Ala	p	N
cHg	3,37	2,90	2,36	2,03	2,59	2,20	0,384	597	
cMeHg	11,81	9,42	5,79	5,57	7,95	5,76	0,268	52	

**Legenda:**

cHg in cMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

buHg: koncentracija  $Hg^{2+}$  v urinu otroka

N = število vzorcev

\*Uporabili Kruskalov - Wallisov test

Ugotovili smo, da pri hrvaški in slovenski populaciji otrok ni statistično značilne povezanosti med genotipi in koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v omenjenih bioloških

vzorcih. Torej določanje genotipa polimorfizma PoliAla pri otrocih nima napovedne vrednosti.

#### 4.4.4. Povezanost polimorfizma Pro198Leu s koncentracijami $Hg^{2+}$ in MeHg v popkovnični krvi novorojenčev in s koncentracijami $Hg^{2+}$ v urinu otrok

Analiza z enosmerno ANOVA je zavrnila statistično značilno povezanost med genotipi in koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi ter koncentracijami  $Hg^{2+}$  v urinu za polimorfizem Pro198Leu tako v populaciji hrvaških kot tudi v populaciji slovenskih otrok. Določanje genotipa za polimorfizem Pro198Leu nima napovedne vrednosti v primerjavi s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih. V Preglednici XVII so zapisane p-vrednosti, ki so višje od 0,05.

**Preglednica XVII: Rezultati polimorfizma Pro198Leu pri hrvaških otrocih s testom ANOVA**

<i>CRO</i> otroci	<i>Povprečne koncentracije posameznih genotipov (ng/g)</i>			Enosmerna ANOVA	
	CC	CT	TT	P	N
cHg	4,13	4,08	5,43	0,330	96
cMeHg	7,39	9,57	9,07	0,201	20
buHg*	0,47	0,27	0,14	0,389	51

Legenda:

cHg in cMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

buHg: koncentracija  $Hg^{2+}$  v urinu otroka

N = število vzorcev

\*Uporabili Kruskalov - Wallisov test

#### 4.4.5. Povezanost kombinacije obeh polimorfizmov s koncentracijami $Hg^{2+}$ in MeHg v krvi, laseh in mleku mater

Kombinacijo genotipov obeh polimorfizmov smo preverjali z dvosmernim ANOVA testom. Uporabili smo enake biološke vzorce, kot pri posameznem polimorfizmu. Rezultati v Preglednici XVIII prikazujejo, da sta le koncentraciji MeHg v popkovnični krvi in mleku mejno statistično značilni z genotipom hrvaških mater. Velja, da se p-vrednosti, nižje od 0,05, statistično značilno porazdeljujejo. Vrednosti med 0,05 in 0,1 smo obravnavali kot mejno statistično značilne vrednosti, pri katerih smo nadalje tudi preverili vplive kovariat.

**Preglednica XVIII: Rezultati kombinacije obeh polimorfizmov pri hrvaških materah**

PoliAla*Pro198Leu	Dvosmerna ANOVA	
CRO mame x CRO mame	p	N
matHg	0,428	181
matMeHg	0,167	43
hHg	0,499	182
hMeHg	0,324	39
cHg	0,396	170
cMeHg	<b>0,078</b>	38
mlekoHg	0,873	101
mlekoMeHg	<b>0,08</b>	21

**Legenda:**matHg in matMeHg: koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v materini krvihHg in hMeHg: koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v lasehcHg in cMeHg: koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v popkovnični krvimlekoHg in mlekoMeHg: koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v mleku

N = število vzorcev

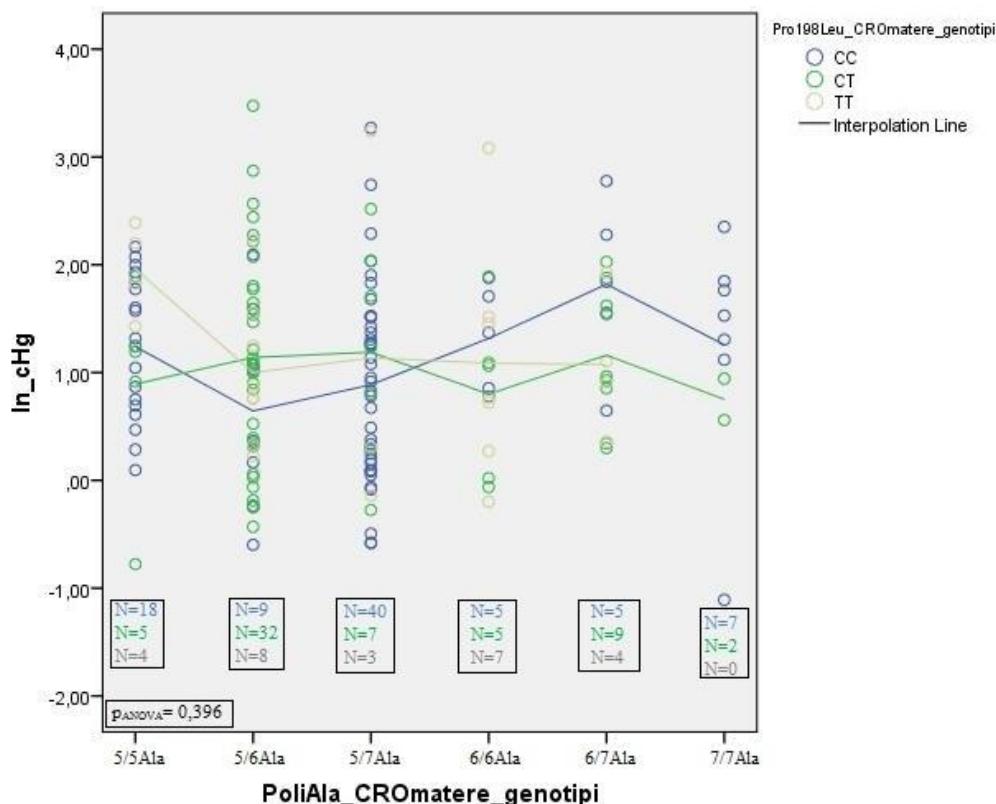
Kovariate smo preverjali s testom ANCOVA, kadar smo z ANOVO dobili statistično značilne ali mejno značilne vrednosti. Preverili smo še korelacijo med kovariato in odvisno spremenljivko (cMeHg, mlekoMeH). Z njimi smo preverjali sovplive, ki skupaj z genotipom statistično značilno vplivajo na koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg. Za kovariate smo uporabili koncentracije esencialnih elementov Mn, Zn in Se v različnih bioloških vzorcih ter opisne spremenljivke preiskovank (starost, ITM, kajenje, VNMK). Koncentracije Mn in Zn so bile izvedene po navodilu proizvajalca naprave Octapole Reaction System (ORS) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (7500ce, Agilent), koncentracije Se so bile izmerjene po principu metode hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS), koncentracije VNMK pa z metodo preestritve *in situ* ter sledoč detekcijo s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID). Vse meritve so bile izvedene na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani (48).

Rezultati testov so povzeti v Prilogi 7 v 7. poglavju. Značilne korelacije so v preglednici označene z znakom \*. Ugotovili smo:

- na koncentracijo MeHg v popkovnični krvi statistično značilno sovpliva le starost matere ( $p_{ANCOVA} = 0,033$ ; N = 35).

Pri koncentracijah MeHg v bioloških vzorcih bi statistično moč lahko še povečali z večjim številom vzorcev. Nobeno število ni presegalo 50 vzorcev. Pri višji starosti so značilne višje koncentracije MeHg v popkovnični krvi, zato bi z izključitvijo tega vpliva statistično moč MeHg med genotipskimi podskupinami še povečali.

V Prilogi 6 (glej poglavje 7. Priloge) so prikazani odstotki kombinacije polimorfizmov glede na koncentracijo  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi. Grafično smo še preverili, kako kombinacija polimorfizmov PoliAla in Pro198Leu vpliva na koncentracijo  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi. Rezultati testa so predstavljeni na Sliki 15.



Slika 15: Povezanost obih polimorfizmov pri hrvaških materah s koncentracijo  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi ( $N =$  število vzorcev)

Iz slike razberemo:

- če je mati nosilka genotipa 5/5 Ala ali 5/7 Ala, prevladuje prisotnost CC polimorfizma, če pa je mati nosilka genotipa 5/6 Ala, prevladuje prisotnost CT polimorfizma,
- posameznice z genotipi 6/6 Ala, 6/7 Ala in 7/7 Ala imajo višje koncentracije  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi z genotipom CC v primerjavi s tistimi, ki imajo genotip CT ali TT,
- posameznice z genotipom 5/6 Ala imajo nižje koncentracije  $Hg^{2+}$  ob prisotnosti genotipa CC, glede na ostala dva genotipa,
- z nižjimi koncentracijami  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi je znižana aktivnost encima GPX1.

#### 4.4.6. Povezanost kombinacije polimorfizmov s koncentracijami $Hg^{2+}$ in MeHg v popkovnični krvi pri novorojencih

Pri hrvaških otrocih smo preverili, če obstajajo statistično značilne povezanosti med združitvijo genotipov obeh polimorfizmov s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi. Rezultati so zapisani v Preglednici XIX.

**Preglednica XIX: Rezultati kombinacije obeh polimorfizmov pri hrvaških otrocih s testom ANOVA**

PoliAla*Pro198Leu		Dvosmerna ANOVA	
<i>CRO</i> otroci x <i>CRO</i> otroci		p	N
cHg	<b>0,055</b>	96	
cMeHg	0,629	20	

**Legenda:**

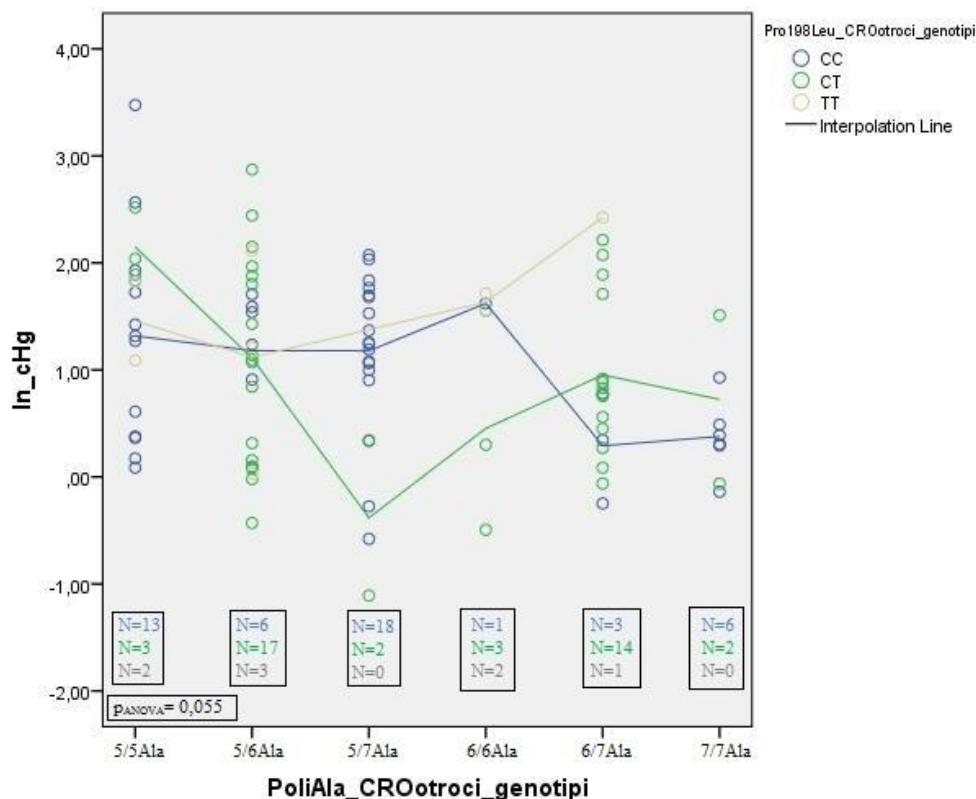
cHg in cMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

N = število vzorcev

Noben test ni dal statistično značilnega rezultata. Mejno statistično značilni rezultat smo dobili pri koncentraciji  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi. S Sliko 16 smo ocenili, kakšne so medsebojne povezave med vrsto genotipa in njegovim vplivom na koncentracijo  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi.

Slika nam prikazuje:

- pri otrocih z genotipom 5/6 Ala ali 6/7 Ala prevladuje polimorfizem CT,
- otroci, ki so nosilci genotipa 5/5 Ala, imajo višje koncentracije  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi z genotipom CC kot otroci nosilci genotipa 7/7 Ala.



Slika 16: Povezanost obeh polimorfizmov pri hrvaških otrocih s koncentracijami  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi ( $N =$  število vzorcev)

Koncentraciji  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi smo nadalje preverili še možnost sovplivov kovariat. Rezultati so zbrani v 7. poglavju v Prilogi 8. Ugotovili smo, da naslednje kovariate (mejno) statistično značilno sovplivajo na koncentracije  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi ob združitvi genotipov obeh polimorfizmov:

- značilno povezani sta koncentracija Se v materini krvi ( $p_{ANCOVA} = 0,038; N = 93$ ) in koncentracija Mn v popkovnični krvi ( $p_{ANCOVA} = 0,044; N = 91$ ),
- mejno značilno povezane so koncentracije Se v popkovnični krvi ( $p_{ANCOVA} = 0,088; N = 96$ ), koncentracije Zn v popkovnični krvi ( $p_{ANCOVA} = 0,077; N = 91$ ), koncentracije Mn ( $p_{ANCOVA} = 0,088; N = 88$ ) in Zn ( $p_{ANCOVA} = 0,087; N = 88$ ) v krvi mater, kombinacija koncentracij Mn in Se v krvi mater ( $p_{ANCOVA} = 0,061; N = 81$ ) in popkovnični krvi ( $p_{ANCOVA} = 0,079; N = 81$ ), kombinacija koncentracij Mn, Se in Zn v krvi mater ( $p_{ANCOVA} = 0,093; N = 88$ ).

4.4.7. Povezanost kombinacij proučevanih polimorfizmov v parih mati - otrok s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

Popkovnična kri je mešana kri. Sestavlja jo materina venska kri in arterijska kri otroka. Uporabljamo jo pri preverjanju povezanosti genotipov posameznega polimorfizma v paru (mati - otrok) s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg. V Preglednici XX smo povzeli rezultate testa dvosmerne ANOVA za posamezni polimorfizem. Ugotovili smo, da ni statistično značilnih povezav.

**Preglednica XX: Rezultati povezanosti genotipov med materjo in otrokom pri posameznem polimorfizmu v odvisnosti koncentracij  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi**

		Dvosmerna ANOVA		
		CRO mame x CRO otroci	p	N
PoliAla	cHg	0,470	157	
	cMeHg	0,118	34	
Pro198Leu	cHg	0,136	79	
	cMeHg	/	16	

**Legenda:**

**cHg in cMeHg:** koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi

**N = število vzorcev**

4.4.8. Haplotipska študija pri hrvaških materah in otrocih

Haplotip je skupina alelov na istem kromosomu, ki se zaradi bližine dedujejo skupaj. V naši študiji smo za hrvaško populacijo mater in otrok vključili kombinacije haplotipov: 5Ala/C, 5Ala/T, 6Ala/C, 6Ala/T, 7Ala/C in 7Ala/T. Izračunali smo frekvence posameznih kombinacij, ki so zbrane v Prilogi 9 (glej poglavje 7. Priloge). Izkazalo se je, da kombinacije 5Ala/C, 6Ala/C, 6Ala/T in 7Ala/C prevladujejo. Naredili smo enosmerne ANOVA teste in preverili povezanost kombinacije haplotipov s koncentracijami  $Hg^{2+}$ , MeHg in Se v določenih bioloških vzorcih. Koncentracije Se smo vključili zraven, da smo preverili, če obstaja kakšna posredna povezava haplotipov s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg. Znano je, da ima  $Hg^{2+}$  visoko afiniteto vezave do prostih Se-ionov. Z vezavo je onemogočeno sodelovanje Se v sintezi selenoencimov. Posledično selenoencimi ne morejo detoksificirati prostih kisikovih radikalov.

Rezultati so zbrani v Preglednici XXI. Ugotovili smo:

- koncentracije Se v mleku so v kombinaciji s haplotipoma 6Ala/C pri hrvaških materah ( $p_{ANOVA} = 0,005$ ;  $N = 103$ ) značilno nižje v primerjavi z odsotnostjo obeh alelov,
- statistično značilno se razlikujeta tudi koncentraciji  $Hg^{2+}$  v mleku ( $p_{ANOVA} = 0,027$ ;  $N = 100$ ) in Se v mleku ( $p_{ANOVA} = 0,035$ ;  $N = 103$ ) s kombinacijo haplotipov 6Ala/T pri hrvaških materah,
- koncentracije Se v mleku so v kombinaciji s haplotipoma 6Ala/T tudi statistično značilno nižje v primerjavi z odsotnostjo obeh alelov.

**Preglednica XXI: Rezultati testa enosmerne ANOVA med kombinacijami haplotipov in koncentracijami  $Hg^{2+}$ , MeHg in Se v bioloških vzorcih**

CRO mame	Haplotipi							
	5Ala/C		6Ala/C		6Ala/T		7Ala/C	
	p	N	p	N	p	N	p	N
mat Hg	0,354	180	0,313	180	0,197	180	0,222	180
mat Se	0,592	175	0,37	175	0,959	175	0,61	175
hHg	0,382	181	0,282	181	0,734	181	0,609	181
cHg	0,126	169	0,143	169	0,268	169	0,165	169
c Se	0,662	168	0,337	168	0,99	168	0,319	168
mlekoHg	0,244	100	0,642	100	<b>0,027</b>	100	0,898	100
mlekoMeHg	0,52	20	0,283	20	0,797	20	0,185	20
mlekoSe	0,658	103	<b>0,005</b>	103	<b>0,035</b>	103	0,158	103
CRO otroci								
cHg	0,644	92	0,88	92	0,888	90	0,134	90

#### Legenda:

matHgin matSe: koncentracije  $Hg^{2+}$  in Se v materini krvi

hHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v laseh

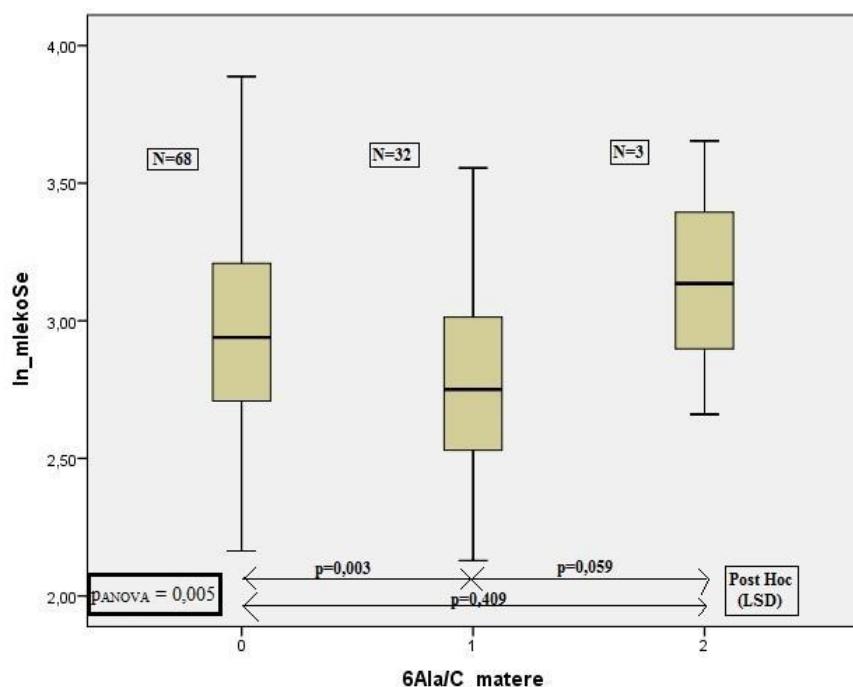
cHg in cSe: koncentracije  $Hg^{2+}$  in Se v popkovnični krvi

mlekoHg, mlekoMeHg, mlekoSe: koncentracije  $Hg^{2+}$ , MeHg in Se v mleku

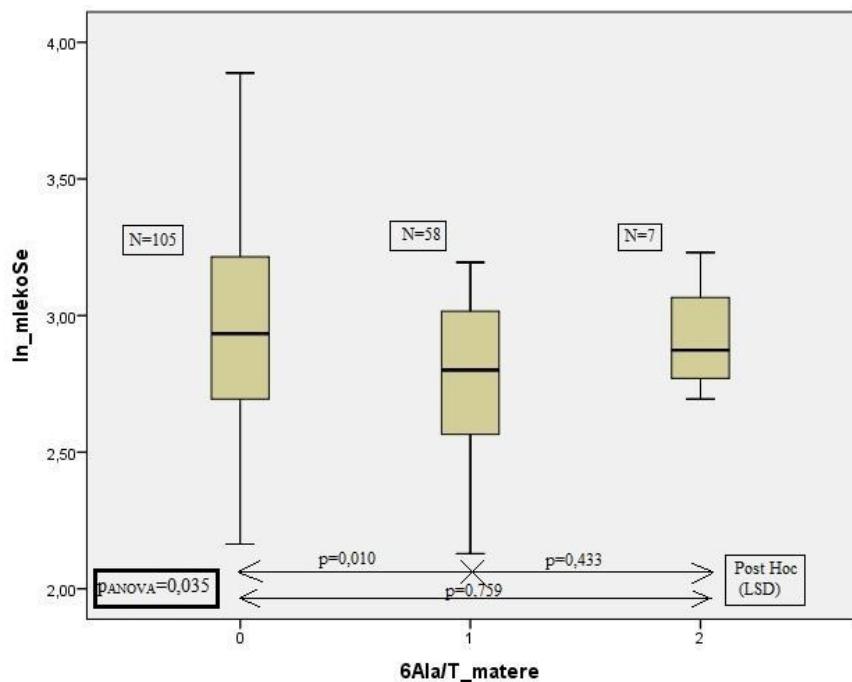
N = število vzorcev

Statistično značilnima rezultatoma koncentracije Se v mleku smo grafično z metodo BoxPlot preverili še medsebojno povezanost med aleli za posamezni kombinaciji haplotipov. Na Sliki 17 je prikazana povezanost koncentracij Se v mleku glede na kombinacijo haplotipa 6Ala/C, na Sliki 18 pa glede na kombinacijo haplotipa 6Ala/T pri hrvaških materah. Na podlagi obeh slik smo ugotovili, da so koncentracije Se v mleku

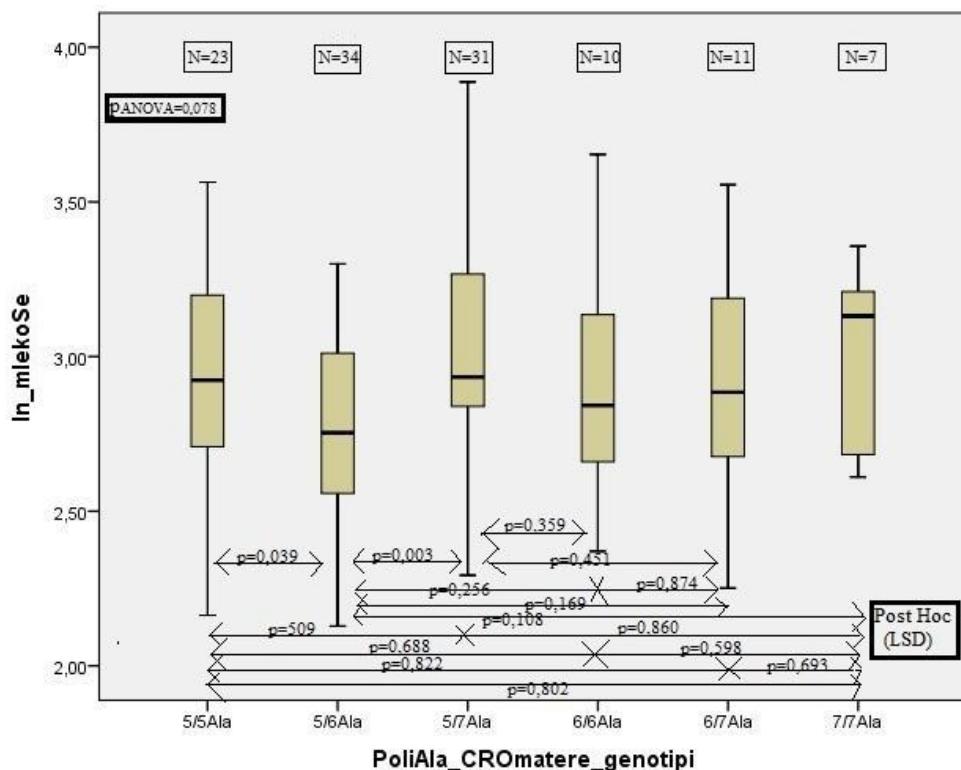
nižje pri kombinaciji haplotipov, ki se ujemajo v enem alelu glede na odsotnost alela. Glede na LSD Post Hoc test smo pokazali, da se koncentracije Se v mleku značilno razlikujejo med ujemanjem enega alela (oznaka 1 na grafu) in odsotnostjo skupnih alelov (oznaka 0 na grafu). Ugotovili smo, da polimorfizem Pro198Leu ne vpliva na koncentracijo Se v mleku, saj smo dobili enak profil porazdelitve pri alelu C kot T. Torej gre samo za učinek alela 6Ala. Na Sliki 19 smo nadalje prikazali porazdelitev koncentracije Se v mleku glede na genotipe polimorfizma PoliAla pri hrvaških materah.



Slika 17: Prikaz razpršenosti koncentracije Se v mleku glede na prisotnost kombinacije alelov 6Ala/C pri hrvaških materah. Oznaka 0 pomeni, da ni ujemanja v alelih, oznaka 1 pomeni, da se ujemata v 1 alelu, oznaka 2 pa ujemanje v obih alelih (N = število vzorcev)



Slika 18: Prikaz razpršenosti koncentracije Se v mleku glede na prisotnost kombinacije alelov 6Ala/T pri hrvaških materah. Oznaka 0 pomeni, da ni ujemanja v alelih, oznaka 1 pomeni, da se ujemata v 1 alelu, oznaka 2 pa ujemanje v obeh alelih (N = število vzorcev)



Slika 19: Prikaz razpršenosti koncentracije Se v mleku glede na polimorfizem PoliAla pri hrvaških materah (N = število vzorcev)

Iz Slike 19 je razvidno, da so ob prisotnosti alela 6Ala koncentracije Se v mleku nižje. V primeru manj aktivnega encima GPX1 imamo torej manj Se v mleku. Torej lahko sklepamo, da je večina prostega Se vezana s Hg<sup>2+</sup>. S Post Hoc (LSD) testi smo ugotovili, da se koncentracija Se v mleku statistično značilno porazdeljuje med genotipskima podskupinama 5/5Ala in 5/6Ala ter podskupinama 5/6Ala in 5/7Ala.

S haplotipsko analizo smo prišli do zaključka, da kombinacije haplotipov nimajo vpliva na koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v bioloških vzorcih, ugotovili pa smo, da imajo določen vpliv na koncentracije Se v mleku. Jablonska in sodelavci (49) so zapisali, da do zdaj še ni znano, kako se aktivnost GPX1 spreminja s koncentracijami Se v bioloških vzorcih glede na genotip.

#### 4.4.9. Povezanost razvitosti otroka pri starosti 1,5 leta s koncentracijami Hg<sup>2+</sup> in MeHg v različnih bioloških vzorcih pri hrvaških in slovenskih otrocih

Ocena razvitosti otroka pri starosti 1,5 leta je bila ovrednotena z ocenami po Bayley-III lestvici. Te so sestavljene iz vprašanj/trditev iz 5 področij:

- kognitivne sposobnosti (COG),
- gorovne sposobnosti (LANG; razdeli se na razumevanje – RC in izražanje – EC),
- motorične sposobnosti (MOT; razdeli se na fino – FC in grobo motoriko – GC),
- družbena vključenost,
- obnašanje otroka, ki je pod vplivom okolja, vzgoje staršev ipd.

Namen je ovrednotiti razvojne funkcije pri dojenčkih in majhnih otrocih ter tako odkriti morebitne nevrološke motnje. Oceno razvitosti otroka po Bayley-III lestvici podajo ustrezno izobraženi psihiatri. Ocene so standardizirane glede na posamezno starostno skupino otrok. Test je primeren za otroke od 1. do 42. meseca starosti (50).

Ta ocena je bila izvedena v večini primerov pri starosti otrok od 16 mesecev in 16 dni ter do starosti 19 mesecev in 15 dni. Sešteli smo točke ocen po Bayley-III lestvici za vsako področje posebej. Osredotočili smo se predvsem na kognitivne (COG), gorovne (LANG) in motorične sposobnosti (MOT). Motorične sposobnosti se razdelijo na razvoj gibanja rok (FM) in na razvoj gibanja celotnega telesa (GM). Za MeHg je znano, da ima nevrotoksične učinke na ljudi. Ferska študija je pokazala povezano med prenatalno izpostavljenostjo Hg<sup>2+</sup> in MeHg in učinki na motorične sposobnosti, govor ter pozornost v starostni skupini 7–14

let. Preverili smo, če obstajajo statistično značilne povezave med koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih ter doseganjem točk po ocenah Bayley-III lestvice, in jih zbrali v Preglednici XXII. Ugotovili smo, da je povezanost med kognitivnimi (miselnimi) sposobnostmi statistično značilna s koncentracijami MeHg v materini krvi ( $p_{ANOVA} = 0,012$ ;  $N = 44$ ). Značilna povezanost se je izkazala tudi med koncentracijo  $Hg^{2+}$  v mleku ( $p_{ANOVA} = 0,005$ ;  $N = 95$ ) in fino motoriko. Statistične značilne povezave so se izkazale le pri otrocih iz Hrvaške. Preučevane populacije otrok nismo združili, ker so oceno razvitosti otroka po Bayley-III lestvici opravljali različni psihiatri in posledično je bil to vzrok za očitno odstopanje ocen. Ocene razvitosti slovenskih otrok so bile v povprečju nižje od hrvaških v enaki starostni skupini.

**Preglednica XXII: Rezultati enosmerne Anove in Kruskalovega - Wallisovega testa (oznaka \*)**

CRO otroci	COG		RC		EC		LANG		FM		GM*		MOT	
	p	N	p	N	p	N	p	N	p	N	p	N	p	N
cHg	0,108	157	0,347	157	0,651	157	0,487	157	0,067	157	0,386	157	0,220	157
cMeHg	0,471	39	0,794	39	0,694	39	0,267	39	0,579	39	0,301	39	0,611	39
matHg	0,119	161	0,176	161	0,372	161	0,624	161	0,128	161	0,274	161	0,238	161
matMeHg	<b>0,012</b>	44	0,240	44	0,873	44	0,988	44	0,619	44	0,347	44	0,901	44
mlekoHg	0,392	95	0,242	95	0,405	95	0,569	95	<b>0,005</b>	95	0,236	95	0,797	95
mlekoMeHg	0,466	25	0,670	25	0,725	25	0,977	25	0,743	25	0,550	25	0,295	25
hHg	0,127	163	0,598	163	0,266	163	0,401	163	0,061	163	0,416	163	0,328	163
hMeHg	0,137	36	0,276	36	0,559	36	0,853	36	0,602	36	0,217	36	0,237	36
SLO otroci	COG*		RC*		EC*		LANG		FM*		GM*		MOT*	
	p	N	p	N	p	N	p	N	p	N	p	N	p	N
cHg	0,636	250	0,778	248	0,755	250	0,413	250	0,275	250	0,467	248	0,833	250
cMeHg	0,692	11	0,286	11	0,217	11	0,401	11	0,256	11	0,216	11	0,259	11

**Legenda:**cHg in cMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvimatHg in matMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v materini krvimlekoHg in mlekoMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v mlekuhHg in hMeHg: koncentracije  $Hg^{2+}$  in MeHg v laseh

COG: kognitivne sposobnosti

RC: razumevanje otroka

EC: izražanje otroka

LANG: govorne sposobnosti

FM: razvoj gibanja rok

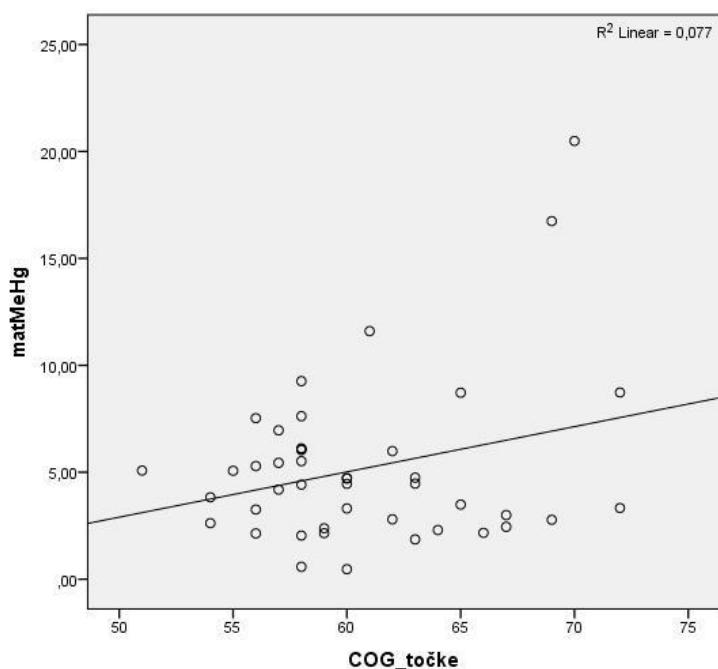
GM: razvoj gibanja celotnega telesa

MOT: motorične sposobnosti

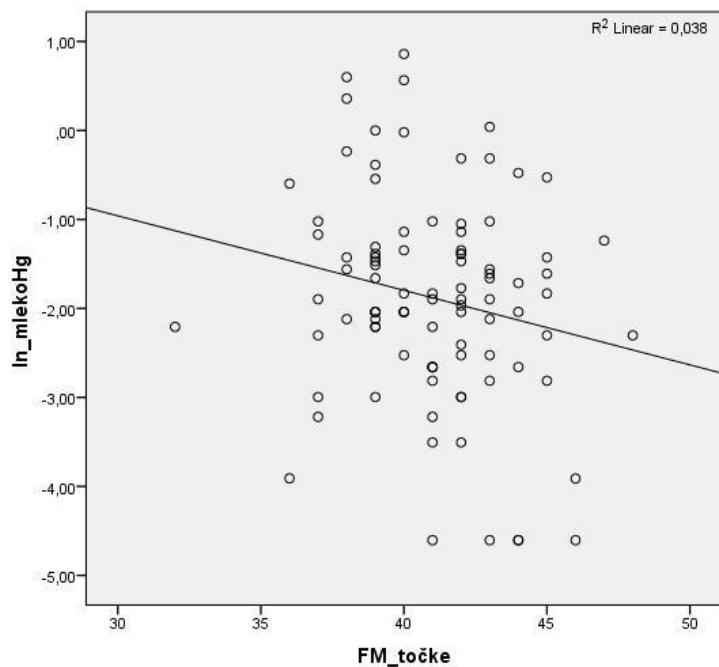
N = število vzorcev

\*Uporabili Kruskalov - Wallisov test

Razpršenost podatkov pri statistično značilnih rezultatih smo prikazali na Sliki 20 in Sliki 21. V Prilogi 10 (glej poglavje 7. Priloge) so zbrani rezultati testiranja povezanosti med genotipi posameznega preučevanega polimorfizma in doseženimi točkami na posameznem področju ocen po Bayley-III lestvici za hrvaške in slovenske otroke. Izkazalo se je, da se nobena vrednost statistično značilno ne razlikuje. Torej lahko zaključimo, da pri proučevani populaciji nismo zasledili toksičnega vpliva  $Hg^{2+}$  oziroma MeHg na razvoj otrok, kar pripisujemo relativno nizki izpostavljenosti mater v nosečnosti tej težki kovini.



Slika 20: Razpršenost koncentracij MeHg v krvi mater glede na dosežek točk ocene kognitivnega (COG) področja hrvaških otrok



Slika 21: Razpršenost koncentracij  $Hg^{2+}$  v mleku glede na dosežek točk ocene za fino motoriko (FM) pri hrvaških otrocih

Zgornji sliki nam prikazujeta, da se z večanjem koncentracije MeHg v krvi matere povečuje število doseženih točk za oceno kognitivnih sposobnosti otroka. Za fino motoriko je prikazano, da nižje število doseženih točk pri otroku pomeni višjo vsebnost  $Hg^{2+}$  v materinem mleku. Treba bi bilo narediti še kakšne študije, da bi lahko potrdili opisane povezave.

## 5. SKLEP

Na podlagi statističnih rezultatov v naši diplomski nalogi smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- naši rezultati ne nakazujejo značilne povezanosti med polimorfizmom PoliAla ali Pro198Leu s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v bioloških vzorcih pri materah;
- pri otrocih ni nobeden proučevan polimorfizem izkazal značilne povezanosti s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v popkovnični krvi;
- kombinacija obeh polimorfizmov pri nosečnicah kaže mejno značilno povezanost s koncentracijami MeHg v popkovnični krvi ( $p_{ANOVA} = 0,078$ ;  $N = 38$ ) in mleku ( $p_{ANOVA} = 0,080$ ;  $N = 21$ );
- pri novorojenčkih smo odkrili mejno značilno povezanost genotipov otrok s koncentracijami  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi ( $p_{ANOVA} = 0,055$ ;  $N = 96$ );
- z združitvijo genotipov mame in otroka po parih nismo dobili signifikantnih povezav pri nobenem polimorfizmu;
- prisotnost alela 5 Ala in 7Ala sta najpogosteje v kombinaciji z genotipom CC tako pri materah kot njihovih otrocih;
- prisotnost alelov 6 in 7, ki sta povezana z nižjo aktivnostjo encima GPX1, imajo ob alelu T najnižje koncentracije  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi, v urinu hrvaških mater pa najvišje koncentracije  $Hg^{2+}$ . Koncentracije se razlikujejo glede na obliko Hg, ki je na voljo;
- hrvaški otroci, ki so nosilci genotipa 5/5Ala, imajo višje koncentracije  $Hg^{2+}$  v popkovnični krvi z genotipom CC kot otroci nosilci genotipa 7/7Ala;
- haplotipska študija je pokazala, da obstaja statistična povezanost med kombinacijo haplotipov 6Ala/C in koncentracijo Se v mleku ter med 6Ala/T in koncentracijama Se in Hg v mleku pri hrvaških materah. Nadalje smo iz grafičnega profila ugotovili, da polimorfizem Pro198Leu nima vpliva na koncentracijo Se v mleku, ampak gre samo za učinek 6 Ala. Ob prisotnosti alela 6Ala so koncentracije Se v mleku najnižje;
- na podlagi ocen razvitosti otroka po Bayley-III lestvici smo ugotovili, da obstaja vpliv višjih koncentracij  $Hg^{2+}$  v mleku in razvitost fine motorične sposobnosti ( $p_{ANOVA} = 0,005$ ;  $N = 95$ ) ter vpliv koncentracije MeHg v krvi matere na razvoj kognitivnih sposobnosti ( $p_{ANOVA} = 0,012$ ;  $N = 44$ );

→ nobenih statistično signifikantnih rezultatov nismo opazili pri kognitivnih/govornih/miselnih sposobnostih v odvisnosti od genotipov pri hrvaških in slovenskih otrocih.

Znano je, da je MeHg najnevarnejša oblika živega srebra, s hudimi posledicami na centralnem živčnem sistemu. Njegova lipidotopnost mu omogoča, da prehaja HEB in v mleko. V nadalnjih raziskavah bi bilo treba povečati statistično moč z večjim številom vzorcev koncentracij MeHg. Glede na dobljene rezultate bi predlagali proučevanje povezanosti kombinacije obeh polimorfizmov s koncentracijami  $Hg^{2+}$  in MeHg v večjem številu bioloških vzorcev. Zanimivo bi bilo proučevati še povezanost koncentracij Se v bioloških vzorcih glede na posamezni genotip.

## 6. LITERATURA

1. [http://en.wikipedia.org/wiki/Mercury\\_%28element%29](http://en.wikipedia.org/wiki/Mercury_%28element%29)
2. <http://www.who.int/ceh/capacity/Mercury.pdf>
3. Klaassen CD.: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of Poisons. 7th Edition, McGraw Hill Companies, Inc., ZDA, 2008: 947-950
4. Holcer NJ, Vitale K, Marič AS, Brumen V, Mustajbegović J, Andabaka D: Fish consumption and mercury body burden in women of reproductive age from urban area in Croatia. Water treatment of technologies for the removal of high-toxicity pollutants. NATO Science for peace and security series C: Environmental Security, 2010: 29-39
5. Hrovat M: Mercury as a global pollutant. Anal Bioanal Chem, Vol.374,2002: 981
6. Harada M: Congenital Minamata Disease: Intrauterine Methylmercury Poisoning, Birth Defects Research (part A): Clinical and Molecular Teratology 88, Wiley-Liss, Inc., 2010: 906-909
7. Al-Saleh I, Al-Sedairi A: Mercury (Hg) burden in children: The impact of dental amalgam. Science of the Total Environment 409, 2011: 3003-3015, DOI:10.1016/j.scitotenv.2011.04.047
8. [http://wwwffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Pipan\\_Nadja\\_dipl\\_nal\\_2012.pdf](http://wwwffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Pipan_Nadja_dipl_nal_2012.pdf)
9. Timbrell J.A.: Principles of Biochemical Toxicology. 4th Edition, King's College London, UK: 387-390
10. Norberg GF, Fowler BA, Norberg M, Friberg L: Handbook on the Toxicology of metals. 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier, ZDA, 2007:79-95
11. Syversen T, Parvinder K: The toxicology of mercury and its compounds. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 26, 2012:215 – 226
12. Sanfeliu C, Sebastiá J,Cristofol R, Rodrígues-Farré E: Neurotoxicity of Organomercurial Compounds. Neurotoxicity research, Vol.5, 2003: 286-306
13. Zalups RK, Ahmad S: Handling of cystein S-conjugates of methylmercury in MDCK cells expressing human OAT.; Kidney International, 68, 2005: 1684-1699
14. Farina M, Rocha JBT, Aschner M: Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. Life Science 89, 2011: 555-563

15. Ceccatelli S, Daré E, Moors M: Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* 188, 2010: 301-308
16. <http://m.mf.uni-lj.si/dokumenti/2a5f5c9ea95742726e0e68e75778263d.pdf>
17. <http://labmed.ascpjournals.org/content/33/8/614.full.pdf>
18. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Zastrupitev\\_%C5%BEivim\\_srebrom](http://sl.wikipedia.org/wiki/Zastrupitev_%C5%BEivim_srebrom)
19. Goyer RA: Transplacental Transport of Lead, *Enviromental Health Perspectives*, Vol.88, 1990, 101-105
20. Klaassen CD.: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of Poisons, 7th Edition, McGraw Hill Companies, Inc., ZDA, 2008:149
21. Chien LC, Gao CS, Lin HH: Hair mercury concentration and fish consumption: Risk and perceptions of risk among women of childbearing age, *Enviromental Research* 110, 2010: 123-129
22. Salehi Z, Esmaili-Sari A: Hair mercury levels in pregnant women in Mahshahr, Iran: Fish consumtion as a determinant of exposure, *Science of the total Enviroment* 408, 2010: 4848-4854
23. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost, *Farmacevtski vestnik*, 63, 2012:153-157
24. Miklavčič A, Stibilj V, Heath E, Polak T, Snoj Tratnik J, Klavž J, Mazej D, Horvat M: Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chemistry*, 2010
25. Schoeman K, Tanaka T, Bend JR, Koren G: Hair mercury Levels of Women of Reproductive Age in Ontario, Canada: Implications to Fetal Safety and Fish Consumtion, *The Journal of Pediatrics* 157, 2010:127-131
26. Llop S, Guxens M, Murcia M, Lertxundi A, Ramon R, Riano I, Rebagliato M, Ibarluzea J, Tardon A, Sunyer J, Ballester F: Prenatal exposure to Mercury and Infant Neurodevelopment in a Multicenter Cohort in Spain: Study of Potential Modifiers. *Am J Epidemiol.* 2012; 175(5): 451-465
27. [www.glutathioneexperts.com](http://www.glutathioneexperts.com)
28. Kobal AB, Prezelj M, Horvat M, Krsnik M, Gibicar D, Osredkar J: Glutathione level after long-term occupational element mercury exposure. *Environ Res*, 2008, 107(1): 115-23
29. [wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva\\_FK/2001-12/Predavanja/Radikali\\_18102011\\_Združljivostni\\_način\\_.pdf](http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2001-12/Predavanja/Radikali_18102011_Združljivostni_način_.pdf)
30. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Antioksidant#Tioredoksinski\\_in\\_glutationski\\_sistem](http://sl.wikipedia.org/wiki/Antioksidant#Tioredoksinski_in_glutationski_sistem)

31. Wang W, Ballatori N: Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacological Reviews*, Vol. 50, No.3, 1998: 335-352
32. Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI: Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois.
33. Brigelius-Flohé R, Maiorino M: Glutathione peroxidases, *Biochem Biophys Acta.*, 2012
34. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein\\_GPX1\\_PDB\\_2f8a.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_GPX1_PDB_2f8a.png)
35. [www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1)
36. Chen C, Yu H, Zhao J, Li B, Qu L, Liu S, Zhang P, Chai Z: The Roles of Serum Selenium and Selenoproteins on Mercury Toxicity in Environmental and Occupational Exposure. *Environmental Health Perspectives*, Vol 114, 2006: 297-301
37. <http://www.biochemia-medica.com/content/molekularni-utječaj-glutation-peroksidaza-u-antioksidacijskim-procesima>
38. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159114/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159114/)
39. Jablonska E, Gromadzinska J, Reszka E, Wasowict W, Sobala W, Szeszenia-Dabrowska N, Boffetta P: Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *Eur J Nutr*, 2009, 48(6): 383-6
40. Mlakar SJ, Osredkar J, Prezelj J, Marc J: The antioxidant enzyme *GPX1* gene polymorphisms are associated with low BMD and increased bone turnover markers. *Disease Markers*, 29, 2010: 1-10
41. [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876)
42. Protokol DNA purification from tissues iz priporočila QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, 3<sup>rd</sup> Ed., 04/2010: 33-36
43. <http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/systems>
44. Walker JM, Rapley R: Molecular Biomethods Handbook. Second Edition, Humana Press, Totowa, USA, 2008: 90-95
45. [http://en.wikipedia.org/wiki/Hardy-Weinberg\\_principle](http://en.wikipedia.org/wiki/Hardy-Weinberg_principle)
46. [www.oege.org/sofware/hardy-weinberg.html](http://www.oege.org/sofware/hardy-weinberg.html)
47. <http://graphpad.com/quickcalcs/chisquared/>
48. <http://sl.coot.si/oprema/institut-jozef-stefan/>
49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415410>
50. [http://www.pearsonassessments.com/hai/images/PDF/Bayley-III\\_Webinar.pdf](http://www.pearsonassessments.com/hai/images/PDF/Bayley-III_Webinar.pdf)

## 7. PRILOGE

### Priloga 1: Značilnosti populacije nosečnic iz Hrvaške

Starost nosečnice (leta)	frekvenca	$\bar{x} \pm SD$
<30	79	$30,42 \pm 4,71$
30-35	80	
>35	24	
ITM pred nosečnostjo (kg/m <sup>2</sup> )		
<18,5	9	$23,17 \pm 4,31$
18,5-24,9	135	
>24,9	39	
Kadilski status		
Nekadilka	109	
Kadilka	14	
Bivša kadilka (kadila 1-5let)	9	
Bivša kadilka (kadila 6-10let)	20	
Uživanje rib (g/teden)		
< 150	29	$303,26 \pm 193,23$
150-300	97	
301-450	46	
451-600	26	
>600	10	
Koncentracije totalne VNMK v serumu (mg/ml)		
< 1,5	7	$1,72 \pm 0,24$
1,5-1,7	26	
>1,7	24	
Koncentracije posameznih vrst VNMK (mg/ml)		
VNMK_C14	57	0,040 ± 0,008
VNMK_C16		0,580 ± 0,141
VNMK_C16:1		0,067 ± 0,015
VNMK_C18:1		0,182 ± 0,080
VNMK_C18:2		0,582 ± 0,139
VNMK_C18:3		0,021 ± 0,004
VNMK_C20:4		0,075 ± 0,034
VNMK_C20:5	57	0,022 ± 0,004
VNMK_C22:5	57	0,034 ± 0,009
VNMK_C22:6	54	0,020 ± 0,001
Koncentracije Hg <sup>2+</sup> in MeHg v krvi, mleku, popkovnični krvi, urinu in laseh		
matHg	212	$2,81 \pm 2,62$
matMeHg	49	$5,16 \pm 3,66$
mlekoHg	118	$0,266 \pm 0,387$
mlekoMeHg	25	$0,172 \pm 0,109$
cHg	197	$4,33 \pm 4,52$
cMeHg	43	$9,23 \pm 6,20$
uHg	210	$1,03 \pm 2,48$
hHg	213	$863,37 \pm 1129,70$

**Legenda:** VNMK...večkrat nenasiječene maščobne kislina; C14...miristinska kislina; C16...palmitinska kislina; C16:1...palmitoleinska kislina; C18:1...oleinska kislina; C18:2...linolna kislina; C18:3... $\alpha$ -linolna kislina; C20:4...eikozatetraenojska kislina; C20:5...eikozapentojska kislina; C22:5...dokozapentaenojska kislina; C22:6...dokozaheksanojska kislina

**Priloga 2: Povprečne koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg slovenskih in hrvaških otrok v popkovnični krvi in urinu**

<b>Koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v popkovnični krvi pri slovenskih novorojenčkih</b>	<i>frekvenca</i>	$\bar{x} \pm SD$
cHg	425	$2,00 \pm 1,75$
cMeHg	14	$6,77 \pm 2,94$
<b>Koncentracije Hg<sup>2+</sup> in MeHg v popkovnični krvi in urinu pri hrvaških novorojenčkih</b>		
cHg	209	$4,30 \pm 4,44$
cMeHg	46	$9,12 \pm 6,11$
buHg	122	$0,67 \pm 3,64$

**Priloga 3: Značilnosti rezultatov testa po Bayley-III lestvici pri hrvaških in slovenskih otrocih**

<i>CRO otroci</i>		
<b>Starost otrok (mesec)</b>	<i>frekvenca</i>	$\bar{x} \pm SD$
> 17	17	$18,07 \pm 3,54$
17 - 18	80	
18 - 19	51	
19 <	15	
<b>Nevrološke sposobnosti</b>	<i>frekvenca</i>	$\bar{x} \pm SD$
COG	163	$60,45 \pm 5,13$
RC		$28,39 \pm 3,54$
EC		$28,20 \pm 6,36$
LANG		$56,59 \pm 9,85$
FM		$40,99 \pm 0,71$
GM		$57,11 \pm 6,36$
MOT		$98,10 \pm 7,07$
<i>SLO otroci</i>		
<b>Starost otrok (mesec)</b>	<i>frekvenca</i>	$\bar{x} \pm SD$
< 17	0	$17,77 \pm 2,83$
17 - 18	109	
18 - 19	145	
19 <	34	
<b>Nevrološke sposobnosti</b>	<i>frekvenca</i>	$\bar{x} \pm SD$
COG	288	$12,82 \pm 0,0$
RC		$12,69 \pm 2,12$
EC		$9,20 \pm 1,41$
LANG		$21,80 \pm 0,71$
FM		$12,25 \pm 1,41$
GM		$9,90 \pm 0,71$
MOT		$22,34 \pm 2,12$

**Priloga 4: Rezultati genotipizacije hrvaških nosečnic in otrok, pridobljenih z metodo DHPLC (PoliAla) in z metodo RFLP (Pro198Leu). Sivi prostori označujejo, da vzorec ni bil na razpolago.**

Vzorec	NOSEČNICE		NOVOROJENČKI	
	PoliAla ( <i>GCG<sub>5-7</sub></i> )	Pro198Leu (rs1050450)	PoliAla ( <i>GCG<sub>5-7</sub></i> )	Pro198Leu (rs1050450)
110001			77	CC
110003			67	
110004			55	CC
110005			56	CT
110006			66	
110008			77	CC
110009			57	
110010			56	
100012	57	CT	57	CC
100013	57	CT	56	
100015	56	CC	56	
100016	67	CC	56	
100017	56	CT		
100018	56		56	TT
100020	67	CT	57	
100021	67	CT		
100022	77	CC	57	CC
100023	55	CT	55	
100024	55	CC	57	
100025	57	CC	56	
100026	57	CC	57	
100027	67	CC	77	
100028	55	CT		
100029	57	CC	57	
100030	66	CC	56	
100031	55	TT	57	
100032	77	CC	77	
100033	56	CC	57	
100035	56	CT	57	CC
100036	55	CT	57	CC
100037	57	CC	55	CC
100038	67	CC	57	
100039	57	CT	67	CT
100040	66	TT	56	
100041	66	TT	67	
100042	67		66	
100043	55	CC	55	
100044	57	CC		
100045	57	CC	55	
100046	57	CC	57	
100047	55	TT	55	TT
100049			57	CC

	NOSEČNICE		NOVOROJENČKI	
vzorec	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)
100050	77	CC	67	
100051	57	CC	56	CT
100052	57	CC	55	CT
100053	55	CC		
100054	55	CC	56	CT
100055	55	CC	57	CC
100056	67	CT	67	
100057	57	CC		
100058	57		67	TT
100059			56	
100060	55	CC	57	
100061			67	
100062	77	CC	77	
100063	57	CC	67	
100064	57	CC	57	
100065	56	TT	66	TT
100066	57	CC	57	CC
100067	67	TT	67	
100068	56	TT	56	
100069	66	TT	56	
100070	56	TT	67	CT
100071	57	CC	55	CC
100072	56	TT	56	
100073	56		56	
100074	56	CT	56	CC
100075	57		55	
100076	57	CC	57	
100077	57	CC	57	
100078	56	CT	55	
100079	57	CC	56	
100080	66	TT	67	CT
100081	56	CT	56	
100082	55	TT	77	
100083	67	CT	77	CC
100084	55	CC	56	
100085	57	TT	56	
100086	66	TT		
100087	56	CT	55	CC
100088	66		67	CT
100089	57	CC	56	CT
100090	67	CT	67	
100091	56	CT	56	CT

	NOSEČNICE		NOVOROJENČKI	
vzorec	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)
100092	66		66	CT
100093	77	CC	67	
100094	56	CT	67	
100095	55	CC	56	
100096	56	CT	67	CT
100097	67	CT	66	
100098	57	CT	77	
100099	56	TT	67	CT
100100	56	CC	56	
100101	66		56	CT
100102	66	TT		
100103	56		66	TT
100104	66	TT	67	CT
100105	66		56	
100106	56	CT		
100107	56	CT		
100108	77	CT		
100109	67		57	CC
100110	57	CC	77	CT
100111	57	CC		
100112			67	
100113	57	CC	55	CC
100114	57			
100115	56	CT		
100116	56	TT	67	
100117	56	CT	56	TT
100118	57	CT	55	CT
100119	55	CC	56	CC
100120	56	CT	55	CC
100121	55	CT	55	CT
100122	66	CT	67	
100123	56	CT		
100124	57	CC	57	CC
100125	56	CT	56	TT
100126	57	CC	67	CT
100127	56	CT	66	
100128	55	CC	56	
100129	57	CC		
100130	55	CC	55	CC
100131	56	CT	55	TT
100132	66	CC	67	CC
100133	55	CC	55	CC

	NOSEČNICE		NOVOROJENČKI	
vzorec	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)
100134	55	TT	56	CT
100135	56	CC	57	CC
100136	56	TT	67	
100137	57	CC	56	
100138	56	CT	77	CC
100139	57	CC	57	CC
100140	56	CT	67	CT
100141	57	CC	57	CC
100142	57	CC	55	CC
100143	56		56	CT
100144	56	CC		
100145	67	TT	57	
100146	57	CT	56	CC
100147	67	CT	57	CT
100148	57	CC	77	CC
100149	55	CC	56	
100150	56	CC	67	CT
100151	57	CC	67	
100152	66	CT	67	CT
100153	57	TT	57	
100154	57	CC	67	CT
100155	56	CT		
100156	56	CT	56	CT
100157	67	CT	66	CC
100158	56	CT	67	CC
100159	56		77	
100160	56		56	CT
100161	66	CT	67	CT
100162	57	CC	57	CC
100163	66	CC		
100164	56	CT		
100165	66	CT	56	
100166	55	TT	55	
100167	56	CT	56	CT
100168	56	CT	67	
100169	55		56	
100170	56	CT	56	CT
100171	57	CC	77	CT
100172	57			
100173	57	CC	56	
100174	56			
100175	55	CC		

	NOSEČNICE		NOVOROJENČKI	
vzorec	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)	PoliAla (GCG <sub>5-7</sub> )	Pro198Leu (rs 1050450)
<b>100176</b>	56	CC	56	CC
<b>100177</b>	77			
<b>100178</b>	67		56	CT
<b>100179</b>	56	CT	56	CT
<b>100180</b>	56		56	CC
<b>100181</b>	55	CT	57	CC
<b>100182</b>	56	CC	55	CC
<b>100183</b>	57	CT	55	CT
<b>100184</b>	57			
<b>100185</b>	56		57	CC
<b>100186</b>	77			
<b>100187</b>	57	CC	57	CC
<b>100188</b>	57	CC	77	CC
<b>100190</b>	67	CC	56	
<b>100191</b>	56	CT	56	CT
<b>100192</b>	67	CT	56	CT
<b>100193</b>	77	CC	57	CT
<b>100194</b>	66	CC	57	CC
<b>100195</b>	57	CC	55	CC
<b>100196</b>	57	CC	77	CC
<b>100197</b>	67		66	TT
<b>100198</b>	56	CC		
<b>100199</b>	77	CT	67	CT
<b>100200</b>	77	CC	57	
<b>100201</b>	57	CC	56	CT
<b>100202</b>	55	CC	55	
<b>100203</b>	57	CC		
<b>100205</b>	56	CC	67	CC
<b>100206</b>	66	CC	56	CC
<b>100207</b>	67			
<b>100208</b>	57			
<b>100209</b>	55		55	CC
<b>100210</b>	67	CT	66	CT
<b>100211</b>	67	CC	66	CT
<b>100212</b>	67			
<b>100213</b>	56	CT	56	CT
<b>100214</b>	55			
<b>100215</b>	67	TT		
<b>100216</b>	67	TT		
<b>100217</b>	55			
<b>100218</b>	55	CC		
<b>100219</b>	57	CC	67	CT

	NOSEČNICE		NOVOROJENČKI	
vzorec	<i>PoliAla (GCG<sub>5-7</sub>)</i>	<i>Pro198Leu (rs 1050450)</i>	<i>PoliAla (GCG<sub>5-7</sub>)</i>	<i>Pro198Leu (rs 1050450)</i>
<b>100220</b>	55	CC		
<b>100221</b>	56	CT		
<b>100222</b>	57	TT		
<b>100223</b>	55	CT		
<b>100224</b>	57	CC		
<b>100225</b>	55	CC		
<b>100226</b>	56	CT	66	
<b>100227</b>	56	CT		
<b>100228</b>	55	CC	55	CC
<b>100229</b>	56	TT		
<b>100230</b>	56	CT	57	CC
<b>100231</b>	66	CT	66	
<b>100232</b>	57	CC		
<b>100233</b>	55	CC	57	CC
<b>100234</b>	57	CC		

**Priloga 5: Rezultati genotipizacije slovenskih otrok, pridobljenih z metodo DHPLC**

vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla
400070	67	400138	56	400199	56
400073	55	400140	55	400200	57
400074	57	400141	57	400201	57
400075	57	400143	67	400206	55
400076	56	400144	55	400207	67
400077	57	400145	57	400208	57
400078	55	400146	67	400209	66
400085	56	400147	56	400210	56
400089	57	400148	56	400211	57
400090	67	400149	55	400212	56
400091	56	400150	57	400213	55
400093	57	400151	67	400214	55
400096	56	400155	56	400215	67
400097	56	400156	56	400221	66
400098	56	400157	67	400222	56
400099	56	400158	77	400226	57
400100	56	400159	56	400228	67
400101	55	400160	77	400229	55
400103	67	400161	56	400230	57
400104	55	400162	56	400231	55
400105	67	400163	66	400232	67
400106	55	400165	55	400233	57
400107	55	400166	55	400235	67
400108	57	400167	67	400237	56
400109	67	400168	67	400238	56
400110	67	400171	55	400239	57
400111	66	400172	55	400240	57
400112	56	400175	67	400241	57
400113	57	400177	55	400242	57
400114	67	400179	57	400248	56
400115	56	400180	56	400250	67
400116	56	400181	57	400251	67
400117	67	400182	55	400252	57
400121	55	400185	55	400253	67
400122	67	400186	67	400254	66
400123	57	400187	56	400255	56
400124	67	400188	56	400256	56
400126	66	400189	77	400259	67
400129	67	400190	56	400260	55
400130	67	400191	67	400261	67
400131	57	400192	67	400262	67
400132	67	400193	77	400263	57
400133	77	400194	67	400267	57
400135	56	400195	56	400268	57
400136	56	400196	67	400269	77
400137	55	400198	56	400270	56

vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla
400271	67	400323	55	400428	67
400273	67	400324	57	400429	66
400274	77	400325	77	400430	67
400275	57	400326	66	400431	77
400276	56	400327	57	400432	57
400277	67	400328	67	400433	67
400280	67	400329	77	400434	56
400281	57	400330	56	400435	55
400282	67	400333	67	400436	57
400283	56	400334	55	400437	66
400284	67	400335	77	400438	56
400285	55	400336	67	400439	57
400286	67	400338	77	400440	57
400287	55	400339	67	400441	66
400289	56	400340	55	400442	55
400290	77	400391	57	400443	56
400292	57	400392	55	400444	56
400293	77	400395	56	400445	56
400294	56	400396	55	400446	67
400295	56	400397	66	400447	67
400296	67	400399	55	400448	66
400297	66	400400	66	400449	55
400298	57	400401	77	400450	67
400299	57	400402	57	400451	57
400300	56	400403	56	400452	57
400301	67	400404	57	400453	66
400302	57	400405	67	400452	57
400303	57	400406	56	400453	66
400304	57	400407	57	400454	56
400305	77	400408	56	400455	56
400306	57	400409	56	400456	67
400307	56	400410	66	400457	77
400308	55	400411	57	400458	56
400309	56	400412	67	400459	57
400310	67	400413	57	400460	57
400311	66	400414	57	400461	57
400312	67	400415	57	400463	55
400313	77	400416	66	400466	56
400314	57	400417	57	400467	57
400315	55	400419	55	400468	67
400316	77	400420	56	400470	57
400317	55	400421	56	400471	67
400318	55	400422	56	400472	67
400319	56	400423	57	400473	57
400320	55	400424	57	400474	57
400321	57	400425	56	400475	56
400322	55	400427	56	400476	55

vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla
400477	57	400548	67	400596	57
400478	56	400550	67	400597	55
400479	55	400551	56	400598	57
400480	57	400552	77	400599	55
400481	77	400553	56	400600	57
400482	57	400554	77	400601	57
400483	56	400555	57	400602	77
400484	56	400556	56	400603	56
400486	67	400557	56	400604	67
400487	57	400558	55	400605	55
400488	56	400559	55	400606	77
400489	56	400560	77	400607	67
400490	55	400561	67	400608	57
400491	66	400562	77	400609	77
400492	56	400563	67	400610	56
400493	56	400564	77	400611	56
400494	55	400565	77	400612	56
400495	67	400566	57	400613	55
400496	55	400567	67	400614	66
400497	56	400568	66	400615	57
400499	56	400569	77	400616	57
400500	57	400570	77	400617	55
400501	77	400571	77	400618	66
400502	67	400572	56	400619	55
400503	67	400573	66	400620	56
400504	55	400574	56	400621	57
400505	55	400575	56	400622	57
400506	56	400576	67	400623	56
400507	56	400577	56	400624	56
400508	57	400578	56	400625	57
400513	67	400579	57	400626	67
400514	56	400580	55	400627	57
400515	56	400581	57	400628	57
400516	55	400582	55	400629	77
400517	55	400583	77	400630	57
400518	55	400584	55	400631	57
400521	57	400585	57	400632	57
400522	66	400586	55	400633	56
400523	56	400587	67	400634	56
400524	55	400588	67	400635	77
400526	56	400589	56	400636	66
400528	67	400590	67	400637	56
400529	56	400591	67	400638	57
400530	56	400592	56	400639	67
400532	57	400593	77	400640	57
400534	57	400594	77	400641	67
400547	56	400595	67	400642	55

vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla	vzorec	PoliAla
<b>400644</b>	55	<b>400649</b>	56	<b>400654</b>	67
<b>400645</b>	67	<b>400650</b>	77	<b>400655</b>	55
<b>400646</b>	55	<b>400651</b>	55	<b>400656</b>	55
<b>400647</b>	57	<b>400652</b>	77	<b>400000</b>	56
<b>400648</b>	56	<b>400653</b>	56		

**Priloga 6: Pogostost kombinacij genotipov obeh polimorfizmov pri hrvaških materah glede na koncentracijo Hg<sup>2+</sup> v popkovnični krvi**

<b>Polimorfizem PoliAla</b>	<b>Polimorfizem Pro198Leu</b>					
	<b>CC</b>		<b>CT</b>		<b>TT</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
5/5 Ala	18	21,4	5	8,3	4	15,4
5/6 Ala	9	10,7	32	53,3	8	30,8
5/7 Ala	40	47,6	7	11,7	3	11,5
6/6 Ala	5	6	5	8,3	7	26,9
6/7 Ala	5	6	9	15	4	15,4
7/7 Ala	7	8,3	2	3,3	0	0

**Priloga 7: Rezultati testa ANCOVA, kjer smo primerjali sovplive kovariat s koncentracijami MeHg v popkovnični krvi in mleku glede na genotipe obeh polimorfizmov**

KOVARIATA	ln cMeHg		mlekoMeHg	
	p	N	p	N
ln mleko Mn	0,867	19	0,068	20
mleko Zn	0,641	19	0,077	20
ln mleko Se	0,292	19	0,054	20
cMn	0,277	37	0,308	19
ln cZn	0,095	37	0,421	19
cSe	0,260*	37	0,436	19
ln matMn	0,163	33	0,163	19
matZn	0,238	33	0,094	19
matSe	0,357*	33	0,130	19
Total VNMK (mg/ml)	0,236*	16	0,149	13
VNMK_14	0,292*	16	0,205	13
VNMK_16	0,321	16	0,223	13
VNMK_16:1	0,191	16	0,202	13
VNMK_18	0,302	16	0,074	13
VNMK_18:1	0,328	16	0,068	13
VNMK_18:2	0,249*	16	0,102	13
VNMK_20:4	0,098	16	0,068	13
VNMK_20:5	0,324	16	0,484*	13
VNMK_22:6	0,342	16	0,257	12
Starost	<b>0,033</b>	35	0,054	21
Kajenje	0,202	32	0,154*	18
ITM	0,212	35	0,181*	21
ln matMn + matSe	0,364	33	0,247	19
ln matMn + matSe + matZn	0,284	33	0,190	19
cMn + cSe	0,401	37	0,157	19
cMn + cSe + ln cZn	0,537	37	0,257	19
ln mlekoMn + ln mlekoSe	0,898	19	0,082	20
ln mlekoMn + ln mlekoSe + mlekoZn	0,251	19	0,138	20
Kajenje + starost	0,079	32	0,156	18
Starost + lnITM	0,070	35	0,089	21
Kajenje + starost + lnITM	0,102	32	0,249	18

**Priloga 8: Rezultati testa ANCOVA, kjer smo primerjali sovplive kovariat s koncentracijo Hg v popkovnični krvi za genotipe obeh polimorfizmov**

KOVARIATA	ln cHg	p	N
ln mleko Mn	0,260*	47	
mleko Zn	0,195	47	
ln mleko Se	0,267*	48	
cMn	<b>0,044*</b>	91	
ln cZn	0,077	91	
cSe	0,088*	96	
ln matMn	0,088	88	
matZn	0,087	88	
matSe	<b>0,038</b>	93	
Total VNMK (mg/ml)	0,645	26	
VNMK_14	0,493	26	
VNMK_16	0,721	26	
VNMK_16:1	0,710	26	
VNMK_18	0,661	26	
VNMK_18:1	0,734	26	
VNMK_18:2	0,464	26	
VNMK_20:4	0,657	26	
VNMK_20:5	0,614	26	
VNMK_22:6	0,780	25	
Starost	0,151*	82	
Kajenje	0,160	77	
ITM	0,258*	81	
ln matMn + matSe	0,061	81	
ln matMn + matSe + matZn	0,093	88	
cMn + cSe	0,079	81	
cMn + cSe + ln cZn	0,108	91	
ln mlekoMn + ln mlekoSe	0,319	47	
ln mlekoMn + ln mlekoSe + mlekoZn	0,339	47	
Kajenje + starost	0,189	76	
Starost + lnITM	0,318	80	
Kajenje + starost + lnITM	0,392	74	

**Priloga 9: Pogostost posameznih kombinacij haplotipov pri hrvaških materah in otrocih**

<i>CRO matere</i>			
<b>kombinacija haplotipa</b>	<i>Skupna Frekvenca</i>	<i>ujemanje 1 alela</i>	<i>ujemanje v obeh alelih</i>
5Ala/C	121	101	20
5Ala/T	63	58	5
6Ala/C	69	64	5
6Ala/T	68	61	7
7Ala/C	75	69	7
7Ala/T	28	28	0

<i>CRO otroci</i>			
<b>kombinacija haplotipa</b>	<i>Skupna frekvenca</i>	<i>ujemanje 1 alela</i>	<i>ujemanje v obeh alelov</i>
5Ala/C	58	46	12
5Ala/T	27	25	2
6Ala/C	42	42	0
6Ala/T	41	38	3
7Ala/C	45	38	7
7Ala/T	20	20	0

**Priloga 10: Rezultati testa enosmerne ANOVA in Kruskalovega - Wallisovega testa (\*), kjer smo primerjali povezanost genotipov posameznega polimorfizma s številom točk na posameznem področju po Bayley-III lestvici za hrvaške in slovenske otroke**

	PoliAla		Pro198Leu	
<i>CRO otroci</i>	<i>p</i>	<i>N</i>	<i>p</i>	<i>N</i>
COG	0,256	133	0,533	69
RC	0,470	133	0,420	69
EC	0,478	133	0,627	69
LANG	0,414	133	0,494	69
FM	0,124	133	0,780	69
GM*	0,390	133	0,378	69
MOT	0,234	133	0,590	69
<i>SLO otroci</i>	<i>p</i>	<i>N</i>		
COG*	0,903	254		
RC*	0,647	254		
EC*	0,363	254		
LANG	0,632	254		
FM*	0,135	254		
GM*	0,797	254		
MOT*	0,293	254		