

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA GALJOT

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA GALJOT

**NEVROTOKSIČNOST IN VLOGA POLIMORFIZMOV V GENIH *GSTM1* IN
GSTT1 PRI PRENATALNI IZPOSTAVLJENOSTI Hg^{2+} IN MeHg**

**NEUROTOXICOLOGY AND THE ROLE OF *GSTM1* AND *GSTT1* GENE
POLYMORPHISMS IN PRENATAL EXPOSURE TO Hg^{2+} AND MeHg**

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Vzorci krvi, urina in popkovnične krvi so bili odvzeti na Hrvaškem (Klinički bolniški centar, Klinika za ginekologijo in porodništvo, Reka) in v Sloveniji (Porodnišnica Ljubljana, UKC Ljubljana) v sklopu raziskav evropskega projekta PHIME (angl. Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata). Meritve koncentracij toksičnih kovin so bile izvedene na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Zahvala

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici asist. dr. Simoni Jurković Mlakar, mag. farm. za vso strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Za prijazno pomoč in praktične nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela magistrske naloge pa se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Predvsem pa se želim zahvaliti vsem mojim bližnjim, ki so me vedno podpirali, spodbujali in razumevajoče spremljali mojo študijsko pot.

Izjava

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

Ljubljana, 2014

Anita Galjot

Predsednica magistrske komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1. Uvod	1
1.1. Živo srebro in njegove spojine	1
1.1.1. Živo srebro v okolju in njegova uporaba.....	1
1.2. Toksičnost živega srebra in njegovih spojin	2
1.2.1. Mehanizem delovanja.....	2
1.2.2. Oksidativni stres kot posledica izpostavljenosti Hg^{2+} in MeHg^+ ter antioksidantni obrambni sistem.....	4
1.2.3. Vpliv ROS na nosečnice in razvoj ploda ter transport snovi preko placente ..	6
1.3. Glutation S-transferaza.....	8
1.3.1. <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	10
1.3.2. Genski polimorfizmi povezani s presnovo Hg^{2+} in MeHg^+	12
2. Namen dela	15
3. Materiali in metode	16
3.1. Preiskovanci	16
3.2. Vzorci	16
3.2.1. Določanje vsebnosti živega srebra in metil-živega srebra.....	16
3.2.2. Izolacija nukleinskih kislin.....	17
3.3. Delecije v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	17
3.3.1. Tripleksna verižna reakcija s polimerazo	17
3.3.1.1. Princip.....	17
3.3.1.2. Reagenti	17
3.3.1.3. Oprema in aparature.....	18
3.3.1.4. Postopek dela	19
3.3.2. Agarozna elektroforeza.....	21
3.3.2.1. Princip.....	21
3.3.2.2. Reagenti	22

3.3.2.3. Oprema in aparature.....	22
3.3.2.4. Postopek dela	23
3.4. Statistične metode.....	24
4. Rezultati in razprava	25
4.1. Optimizacija tripleksne PCR reakcije	25
4.2. Značilnosti preiskovane populacije	27
4.3. Klinični pomen genetskih sprememb v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri izpostavljenosti toksičnim vplivom Hg^{2+} in $MeHg^+$	28
4.3.1. Pogostost delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri hrvaških vzorcih.....	28
4.3.2. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu <i>GSTT1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih.....	30
4.3.3. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu <i>GSTM1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih.....	34
4.3.4. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih <i>GSTM1</i> ter <i>GSTT1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih.....	36
4.3.5. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih <i>GSTM1</i> ter <i>GSTT1</i> pri materah in otrocih (po parih), koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih	39
4.3.6. Pogostost delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri slovenskih vzorcih.....	41
4.3.7. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu <i>GSTT1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih.....	42
4.3.8. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu <i>GSTM1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih.....	47
4.3.9. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih <i>GSTM1</i> ter <i>GSTT1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih.....	48

4.3.10. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih <i>GSTM1</i> ter <i>GSTT1</i> , koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo pri združeni populaciji hrvaških in slovenskih otrok.....	52
5. Sklep	55
6. Literatura.....	57
7. Priloge.....	61
7.1. Lastnosti preiskovane populacije	61
7.2. Pogostost delecij v celotni preiskovani populaciji	62
7.3. Rezultati genotipizacije	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Kroženje Hg^{2+} in $MeHg^+$ (5)	1
Slika 2: Cisteinski konjugat	3
Slika 3: Metionin	3
Slika 4: Pregled oksidativnega stresa (16).....	5
Slika 5: Zgradba posteljice (23).....	8
Slika 6: Homozigotna delecija <i>GSTM1</i>	11
Slika 7: Homozigotna delecija <i>GSTT1</i>	12
Slika 8: Odsek gena <i>GSTM1</i> , ki se pomnožuje v reakciji PCR.....	21
Slika 9: Odsek gena <i>GSTT1</i> , ki se pomnožuje v reakciji PCR.....	21
Slika 10: Prikaz produktov tripleksne PCR reakcije na agaroznem gelu	26

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Akutne in kronične zastrupitve (9).....	2
Preglednica II: Genski polimorfizmi antioksidantnih encimov povezani s presnovo živega srebra (38).....	13
Preglednica III: Začetni oligonukleotidi.....	18
Preglednica IV: Reagenti za tripleksno PCR reakcijo.....	20
Preglednica V: Pogoji tripleksne PCR reakcije.....	20

Preglednica VI: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov.....	21
Preglednica VII: Pogostost delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri nosečnicah	28
Preglednica VIII: Pogostost delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri otrocih	29
Preglednica IX: Pogostost delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri Kavkazijcih in pri hrvaških preiskovancih vključenih v našo raziskavo (43).....	30
Preglednica X: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri nosečnicah za gen <i>GSTT1</i>	31
Preglednica XI: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za gen <i>GSTT1</i>	34
Preglednica XII: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri nosečnicah za gen <i>GSTM1</i>	35
Preglednica XIII: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za gen <i>GSTM1</i>	36
Preglednica XIV: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri nosečnicah za kombinacijo delecij v obeh genih.....	37
Preglednica XV: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za kombinacijo delecij v obeh genih	38
Preglednica XVI: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri materah in otrocih za kombinacijo delecij v obeh genih	40
Preglednica XVII: Pogostost delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i> pri otrocih.....	41
Preglednica XVIII: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za gen <i>GSTT1</i>	43
Preglednica XIX: Rezultati statističnih testov ANOVE pri otrocih za gen <i>GSTM1</i>	48
Preglednica XX: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za kombinacijo delecij v obeh genih	49
Preglednica XXI: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri združeni populaciji otrok za kombinacijo delecij v obeh genih	52
Preglednica XXII: Lastnosti nosečnic iz Hrvaške	61
Preglednica XXIII: Lastnosti hrvaških novorojenčkov	62
Preglednica XXIV: Lastnosti preiskovane populacije nosečnic iz Slovenije.....	62
Preglednica XXV: Pogostost delecij pri celotni preiskovani populaciji	62

Preglednica XXVI: Rezultati genotipizacije hrvaških vzorcev	63
Preglednica XXVII: Rezultati genotipizacije slovenskih vzorcev	71

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Pogostost kombinacij delecij v obeh genih pri hrvaških nosečnicah	28
Graf 2: Pogostost kombinacij delecij v obeh genih pri hrvaških novorojenčkih.....	29
Graf 3: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg ⁺ v krvi mater povezane z delecijo v genu <i>GSTT1</i>	32
Graf 4: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg ⁺ v popkovnični krvi povezane z delecijo v genu <i>GSTT1</i>	33
Graf 5: Odvisnost vrednosti lnMOT od kombinacije genotipov mater in otrok	40
Graf 6: Pogostost kombinacij delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	42
Graf 7: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg ⁺ v popkovnični krvi povezane z delecijo v genu <i>GSTT1</i>	44
Graf 8: Povprečne vrednosti COG povezane z delecijo v genu <i>GSTT1</i>	45
Graf 9: Povprečne vrednosti LANG povezane z delecijo v genu <i>GSTT1</i>	46
Graf 10: Povprečne vrednosti MOT povezane z delecijo v genu <i>GSTT1</i>	46
Graf 11: Povprečne vrednosti lnCOG povezane z možnimi kombinacijami delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	50
Graf 12: Povprečne vrednosti lnLANG povezane z možnimi kombinacijami delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	50
Graf 13: Povprečne vrednosti lnMOT povezane z možnimi kombinacijami delecij v genih <i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	51
Graf 14: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg ⁺ v popkovnični krvi povezane z možnimi kombinacijami delecij v obeh genih	53

POVZETEK

Živo srebro (Hg^{2+}) in metilirano živo srebro (MeHg^+) lahko povzročata nepopravljive poškodbe živčnega sistema, pri čemer je MeHg^+ bistveno bolj nevrotoksičen in lipofilen. Izpostavljenost omenjenim oblikam živega srebra pa je še posebej nevarno pri nosečnicah, saj lahko prehajata preko posteljice in krvno-možgansko pregrado. Novorojenčki so torej že prenatalno izpostavljeni živemu srebru preko matere, kar lahko povzroči nevrološke razvojne nepravilnosti, ki se kažejo že v prvih letih življenja. Metabolizem Hg^{2+} in MeHg^+ poteka tudi s pomočjo encimov glutationskega sistema. Možni genetski polimorfizmi encimov tega sistema pa lahko pri posameznikih vplivajo na različen metabolizem ksenobiotikov in toksičnih kovin.

V magistrski nalogi smo poskušali raziskati povezanost delecij v genih, ki nosijo zapis za encima glutation S-transferazo mu1 (gen *GSTM1*) in glutation S-transferazo theta1 (gen *GSTT1*) z nevrotoksičnostjo MeHg^+ in Hg^{2+} . Iskali smo povezanost koncentracij Hg^{2+} in MeHg^+ v materini krvi, popkovnični krvi in urinu otroka z morebitno nevrotoksičnostjo, ki je bila ocenjena glede na kognitivne (COG), retorične (LANG) in motorične sposobnosti (MOT) otrok, starih 18 mesecev. V raziskavo smo vključili 212 nosečnic in 165 novorojenčkov iz Hrvaške ter 405 novorojenčkov iz Slovenije. Delecije v genih smo določili s pomočjo tripleksne metode z verižno reakcijo s polimerazo ter z agarozno gelsko elektroforezo. Učinke na centralni živčni sistem otrok so ocenili z Baylejevo lestvico. Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo programa SPSS, pri čemer smo obravnavali ločeno populacijo nosečnic, hrvaških in slovenskih otrok, matere in otroke (po parih) ter na koncu še hrvaške in slovenske otroke skupaj.

Ugotovili smo, da je delecija v genu *GSTT1* pri nosečnicah (mejno) statistično značilno povezana s povišanimi koncentracijami MeHg^+ v krvi matere ($p=0,08$) in v popkovnični krvi ($p=0,03$). Poleg tega je delecija v genu *GSTT1* pri slovenskih otrocih (mejno) statistično značilno povezana s povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi ($p=0,01$) ter znižanimi vrednostmi nevroloških testov (COG ($p=0,01$), LANG ($p=0,09$) in MOT ($p=0,01$)). Ugotovili smo tudi, da obstaja statistično značilna povezava med

prisotnostjo delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* mater in otrok (po parih) ter znižanimi vrednostmi nevroloških motoričnih testov (MOT ($p=0,01$)). Poleg omenjenega smo pri slovenskih otrocih ugotovili tudi (mejno) statistično značilno povezano med delecijo v obeh omenjenih genih in povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi ($p=0,02$) ter nižjimi vrednostmi nevroloških testov (MOT ($p=0,04$), LANG ($p=0,08$), COG ($p=0,07$)). Pri združeni populaciji slovenskih in hrvaških otrok pa smo ugotovili statistično značilno povezavo med kombinacijo obeh delecij s povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi ($p=0,03$). V urinu otrok povezanosti delecij s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ nismo dokazali.

Glede na rezultate lahko zaključimo, da ima prisotna delecija v genu *GSTT1* v nasprotju s prisotno delecijo v genu *GSTM1* pomembno vlogo pri presnovi MeHg^+ ter vpliv na nevrološki razvoj otrok. Iz rezultatov lahko razberemo, da višje koncentracije MeHg^+ v popkovnični krvi ob prisotnosti delecije v genu *GSTT1*, posamičnega ali v kombinaciji z delecijo v genu *GSTM1*, dodatno vplivajo na nevrološke sposobnosti otrok.

ABSTRACT

Mercury (Hg^{2+}) and methylmercury (MeHg^+) can cause irreversible damage to the nervous system. Exposure to both of the mentioned chemical entities is particularly problematic in the group of pregnant women, because it can easily cross the placenta and the blood-brain barrier. Newborns are therefore prenatally exposed to mercury, what could lead to neurological developmental disorders, appearing in the first years of life. Different metabolism of Hg^{2+} and MeHg^+ in individuals could be associated with their polymorphisms in genes encoding for glutathione system-related enzymes.

The aim of our research was to estimate the association between *glutathione S-transferase mu 1* and *glutathione S-transferase theta 1* gene deletions and concentrations of MeHg^+ and Hg^{2+} in maternal blood, cord blood and urine in children and the potential neurotoxicity (i.e. the cognitive (COG), speech (LANG) and motor (MOT) skills) in children at 18 months of age. For that purpose, 212 pregnant women and 165 newborns from Croatia and 405 newborns from Slovenia were recruited in the study. For determination of polymorphisms we used a multiplex polymerase chain reaction (PCR) followed by agarose gel electrophoresis. Central nervous system effects of children were evaluated with Bayley's score test. The results were statistically analyzed with SPSS. We looked for significant associations between genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* genes, alone or in the combination, and Hg^{2+} and MeHg^+ concentrations in biological samples and the possible neurotoxicity of children at age of 18 months. We studied on the population of pregnant women, the population of Croatian and Slovenian children separately first, secondly we analyzed mothers-children pairs and finally the whole populations of Slovenian and Croatian children together.

We have found out that *GSTT1* gene deletion in a population of pregnant women is (borderline) statistically significantly associated with higher MeHg^+ concentrations in maternal blood ($p=0,08$) and in cord blood ($p=0,03$). In addition, the *GSTT1* gene deletion in a population of Slovenian children is (borderline) statistically significantly associated with higher MeHg^+ concentrations in cord blood ($p=0,01$) and lower values of neurological

tests (COG ($p=0,01$), LANG ($p=0,09$) and MOT ($p=0,01$)). Furthermore, the statistically significant association between deletion polymorphisms of mothers-children pairs and lower values of neurological motor domains test (MOT ($p=0,01$)) has been found. Additionally, the associations between combination of both deletion polymorphisms in a population of Slovenian children and higher MeHg^+ concentrations in cord blood ($p=0,04$) and lower values of neurological tests (COG ($p=0,07$), LANG ($p=0,08$) and MOT ($p=0,04$)) have been confirmed with the (borderline) statistical significances. Moreover, the statistically significant association between combination of both deletion polymorphisms in whole populations of Slovenian and Croatian children and higher MeHg^+ concentrations in cord blood ($p=0,03$) has been found. No statistical significant association between combination of both deletion polymorphisms and $\text{Hg}^{2+}/\text{MeHg}^+$ concentrations in the urine of children has been detected.

Based on our findings we can conclude that *GSTT1* gene deletion polymorphism has an important role in the metabolism of MeHg^+ and neurological effects of children. From the results we can confirm that higher MeHg^+ concentrations in cord blood in the presence of *GSTT1* gene deletion, alone or in combination with *GSTM1* gene deletion, could affect the reduced neurological abilities in children.

SEZNAM OKRAJŠAV

3'UTR	neprevedena regija na 3'koncu
5'UTR	neprevedena regija na 5'koncu
AAS	atomska absorpcijska spektroskopija
Babyurine Hg ²⁺	koncentracija Hg ²⁺ v urinu otroka
Bcrp	rezistenten protein izoliran pri raku dojke
bp	bazni par
CA	celulozni acetat
COG	kognitivne (miselne) sposobnosti
cord MeHg ⁺	koncentracija MeHg ⁺ v popkovnični krvi
CŽS	centralni živčni sistem
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ER	endoplazmatski retikulum
GCLC	encim glutamat-cistein ligaza
GCLM	genski modifikator podenote glutamil-cistein ligaze
GGT1	encim gama-glutamiltransferaza 1
GPx = GSH-Px	encim glutation preroksidaza
GPX1	encim glutation preroksidaza 1
GR, GSR	encim glutation reduktaza
GSH	glutation
GSS	encim glutation sintetaza
GSSG	glutation disulfid
GSTM1	encim glutation S-transferaza mu1
<i>GSTM1</i>	gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu1
<i>GSTM1</i> ⁰	delecija gena, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu1
GSTT1	encim glutation S-transferaza theta1
<i>GSTT1</i>	gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza theta1
<i>GSTT1</i> ⁰	delecija gena, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza theta1
GSTP1	encim glutation S-transferaza pi1

H ₀	ničelna hipoteza
H _a	alternativna hipoteza
LANG	retorične (govorne) sposobnosti
ln cord Hg ²⁺	logaritmirane vrednosti koncentracije Hg ²⁺ v popkovnični krvi
ln cord MeHg ⁺	logaritmirane vrednosti koncentracije MeHg ⁺ v popkovnični krvi
ln maternal Hg ²⁺	logaritmirane vrednosti koncentracije Hg ²⁺ v krvi mater
Maternal MeHg ⁺	koncentracija MeHg ⁺ v krvi mater
MOT	motorične (gibalne) sposobnosti
Mrp1	protein povezan z rezistenco na več spojin tipa 1 (angl. multiresistant drug protein 1)
Mrp2	protein povezan z rezistenco na več spojin tipa 2 (angl. multiresistant drug protein 2)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NCBI	nacionalni center za biotehnološke informacije (angl. National Center for Biotechnology Information)
P- gp	P- glikoprotein
PAGE	poliakrilamidni gel
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species)
SEPP1	selenoprotein 1
SNP	enonukleotidni polimorfizem (angl. single nucleotide polymorphism)
SOD	superoksidna dismutaza
T	temperatura
TRX	tioedoksin
TrxR	encim tiorredoksin reduktaza
UV	ultravijolična svetloba
γ-GCL	encim γ-glutamilcistein sintaza

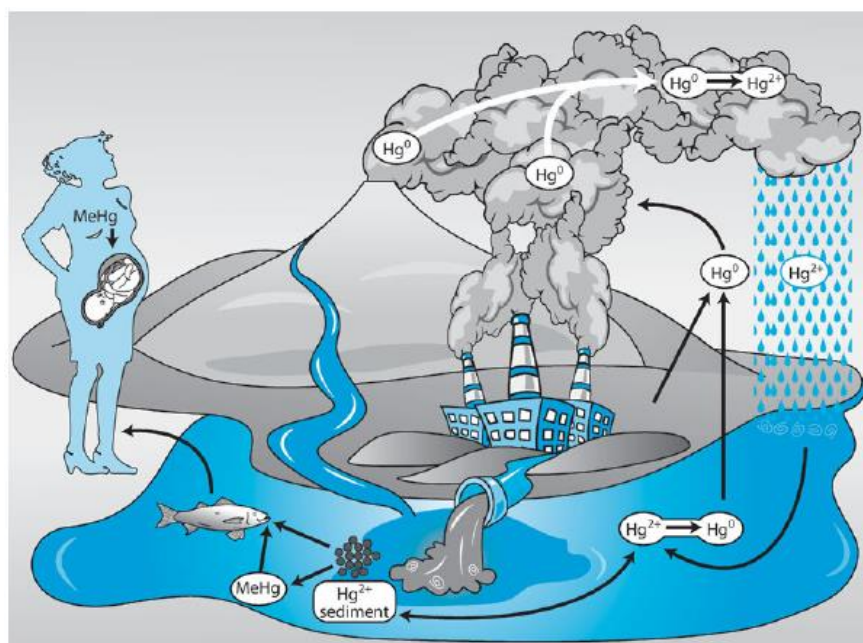
1. Uvod

1.1. Živo srebro in njegove spojine

Živo srebro je kovina, ki se v periodnem sistemu nahaja med prehodnimi elementi (1). Je edina kovina, ki se pri sobni temperaturi nahaja v tekočem stanju (2). Nahaja se v treh oblikah, in sicer kot elementarno (Hg^0), anorgansko (Hg^{1+} , Hg^{2+}) in organsko živo srebro (metil- Hg^+ , fenil- Hg). Vse te oblike so toksične (3,4).

1.1.1. Živo srebro v okolju in njegova uporaba

Živo srebro se v okolju nahaja v hlapni obliki (95%) in v obliki delcev. Prisotno je tudi v hrani, predvsem v velikih ribah. Viri človeškega onesnaževanja z živim srebrom je industrija za predelavo odpadkov in proizvodnjo merilne opreme, fluorescentnih svetilk, baterij, pesticidov ter kozmetike. Naravni viri onesnaževanja pa so vulkani ter vode, ki prihajajo iz rudnikov živega srebra in vulkanov. Anorgansko živo srebro se lahko s pomočjo nekaterih mikroorganizmov v okolju metilira. Metilacija poveča prisotnost MeHg^+ , ki lahko s pomočjo planktona preide v vodne sisteme in vzdolž prehranske verige povzroči kronično izpostavljenost ljudi (Slika 1).



Slika 1: Kroženje Hg^{2+} in MeHg^+ (5)

Pri nosečnicah glavni vir živega srebra predstavlja izpostavljenost hlapom živega srebra, pretirano uživanje rib ter amalgamske zobne zalivke. Študije so pokazale višjo raven živega srebra pri otrocih, katerih mame so bile v času nosečnosti izpostavljene novonastalim amalgamskim zobnim zalivkom. Posledično so nekatere razvite države v času nosečnosti omejile uporabo le-teh (6).

1.2. Toksičnost živega srebra in njegovih spojin

Živo srebro in njegove spojine, še posebej MeHg^+ , imajo toksičen vpliv na človeško telo (7). Vpliv je največji na CŽS in ledvice. Poleg toksičnosti je znan tudi vpliv na imunski odziv, saj je živo srebro eno izmed vzrokov nastanka avtoimunskih bolezni (8).

1.2.1. Mehanizem delovanja

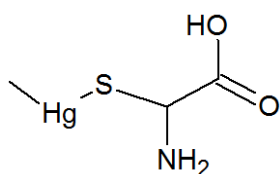
Živo srebro *in vivo* tvori vezi s sulfhidrilnimi, fosfatnimi, karboksilnimi, amidnimi in aminskimi funkcionalnimi skupinami. Deluje tudi na različne proteine in encime, ki imajo v svoji zgradbi omenjene funkcionalne skupine. Toksično delovanje je odvisno od oblike živega srebra, časa izpostavitve in tkiva, na katerega toksično deluje (Preglednica I).

Preglednica I: Akutne in kronične zastrupitve (9)

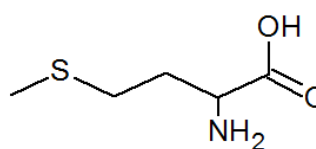
Oblika živega srebra	Čas izpostavitve	Bolezen	Razpolovni čas ($t_{1/2}$)
Hlapi elementarnega živega srebra	akutna	pneumonitis, edem	10 do 15 dni
Anorganske spojine živega srebra	akutna	gastroenteritis, tubulna nekroza, ledvična odpoved	65 do 70 dni
Hlapi elementarnega živega srebra	kronična	tremor, duševna nestabilnost	10 do 15 dni
Organsko živo srebro	kronična	parestezije, ataksija, okvare sluha, govora in vida	70 do 90 dni

Absorbcija elementarne oblike živega srebra (Hg^0) v večini poteka preko pljuč (80%). Omenjena oblika lahko prehaja preko posteljice in krvno-možgansko pregrado ter

povzročča nevrotoksičnost. Hg^0 se lahko s pomočjo encima katalaze oksidira v Hg^{2+} . Absorpcija organskega živega srebra (MeHg^+) je zelo dobra in v večini poteka preko prebavil (95%). MeHg^+ prehaja preko posteljice in krvno-možgansko pregrado ter povzročča nevrotoksičnost (5,10). Hg^0 in MeHg^+ po vstopu v CŽS v možganih inhibirata metabolizem piruvata, laktat dehidrogenazo ter sintetazo maščobnih kislin in povzročita spremembe strukturnih proteinov ter encimskih sistemov. Pri tem pride do blokade sinaptičnih in živčno-mišičnih signalov (9,11). Značilnost toksičnosti MeHg^+ je njegoa konjugacija z GSH, pri čemer po cepitvi glutaminske kisline in glicina nastane cisteinski konjugat (Slika 2). Ta konjugat je lipofilen, analogna spojina metioninu (Slika 3), ki pa je substrat za specifične prenašalce. Zaradi te lastnosti lahko prehaja v astrocite, interagira s tiolnimi skupinami proteinov, poškoduje nevrone in celice (4). V primeru poškodbe celične membrane lahko pride do vpliva na koncentracijo kalcija. MeHg^+ inhibira aktivnost Ca^{2+} črpalke, kar vodi v povečano koncentracijo Ca^{2+} v citosolu in se odraža v prepustnosti membrane ter v motnjah neurotransmitrskih signalov. Vpliva na funkcijo specifičnih neurotransmitrskih receptorjev, in sicer na nikotinske in muskarinske receptorje. Zelo pomembna je konformacijska sprememba pri receptorjih GABA. MeHg^+ blokira polimerizacijo tubulov v mikrotubulih in tako *in vitro* inhibira mitozo v glia celicah. Pri tem lahko pride do porušitve citoskeleta v živčnih celicah. Znana je tudi povezava MeHg^+ s koncentracijo Zn^{2+} v odvisnosti od povišane koncentracije Ca^{2+} . Možno je, da MeHg^+ v proteinih izpodrine Zn^{2+} , kar lahko vpliva na delovanje in poškodbe možganov. Visoke koncentracije omenjene spojine povzročijo apoptozo in nekrozo. V proces apoptoze so vključene mikrotubularne motnje, sprememba prepustnosti membrane mitohondrijev, izguba membranskega potenciala v mitohondrijih, nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in izčrpavanje GSH (12).



Slika 2: Cisteinski konjugat

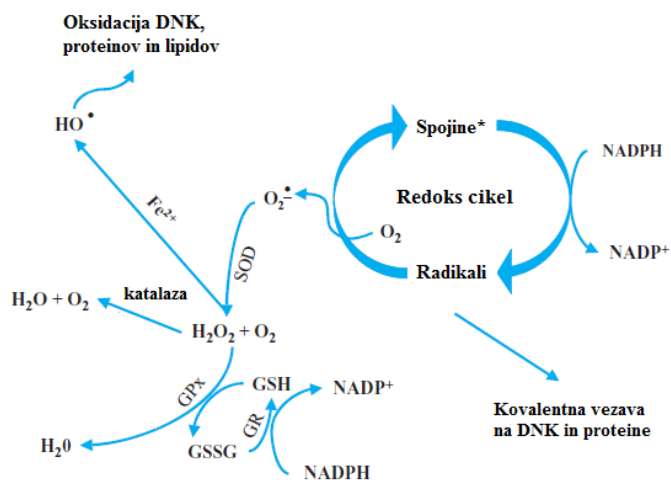


Slika 3: Metionin

Absorpcija anorganskega živega srebra (Hg^+ , Hg^{2+}) je slaba in poteka preko prebavil (7-15%). Prehod preko posteljice in krvno-možganske pregrade je zanemarljiv (5). Zaradi kopičenja v ledvicah povzroča nefrotoksičnost. Prehod vanje je odvisen od vezave Hg^{2+} na proteine in peptide na SH- skupine v krvi ter na albumin. Prehod v proksimalne tubule poteka s pomočjo dveh mehanizmov. Pri prvem mehanizmu je prehod mogoč s pomočjo γ -glutamil transpeptidaze in cisteinglikonaze. Transport preko bazolateralne membrane pa poteka ob pomoči ionskih prenašalcev. V proksimalnih tubulih je okvara celic povezana z motenim delovanjem mitohondrijev, katerih ena izmed nalog je inhibicija živega srebra. Pri motenem delovanju mitohondrijev igra pomembno vlogo oksidativni stres. S tem pride do motenj kontrole dihalne verige v ledvičnih celicah, še posebej pri reabsorpciji (13). Akumulacija živega srebra v lizosomih poveča aktivnost kisle fosfataze, ki prav tako povzroča toksičnost, saj povzroči poškodbo celic (11).

1.2.2. Oksidativni stres kot posledica izpostavljenosti Hg^{2+} in MeHg^+ ter antioksidantni obrambni sistem

Oksidativni stres nastane zaradi porušenega ravnotežja med antioksidanti in prooksidanti, pri čemer gre za patološko stanje, ki se pojavi zaradi prekomerne tvorbe radikalov in ostalih reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) ali nezadostnega antioksidantnega sistema (14,15). ROS nastajajo pri številnih encimskih in redoks reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektronov. Mehanizem nastanka ROS vključuje redoks cikel, interakcije z elektronsko prenašalno verigo (to poteka v mitohondrijih, mikrosomih in kloroplastih) in fotosenzibilizacijo. V redoks cikel so vključeni fenoli, kinoni, aromatske nitro spojine, azo spojine, kovine in hidroksifumarati (na Sliki 4 označeno kot spojine*). V tem ciklu spojine s pomočjo encima reduktaze od reduciranega kofaktorja (NADH, NADPH) sprejmejo elektron (H^+). Ob prisotnosti kisika pa nastanejo kisikovi radikali (16). ROS lahko povzročijo epigenetske in genotoksične poškodbe v celici, poškodbe pa so intenzivnejše pri nezadostnem antioksidantnem obrambnem mehanizmu (15).



Slika 4: Pregled oksidativnega stresa (16)

DNK - deoksiribonukleinska kislina, OH - hidroksilni radikal, Fe^{2+} - železov ion, H_2O - voda, O_2 - kisik, H_2O_2 - vodikov peroksid, GPx - encim glutation preroksidaza, GSSG - glutation disulfid, GR - encim glutation reduktaza, GSH - glutation, NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat.

Živo srebro je zaradi tvorbe ROS eden izmed povzročiteljev oksidativnega stresa. Znano je, da je CŽS zelo občutljiv na oksidativni stres, saj nezadostna antioksidantna obramba deluje v nasprotju s povečano presnovno aktivnostjo. Številne študije so pokazale, da lahko toksični vpliv živega srebra zmanjšamo s pomočjo selenita (selenijev oksid) in antioksidanta vitamina E. Presežna količina ROS lahko nastane zaradi primarne poškodbe mitohondrijev ali zaradi aktivirane pozitivne zanke (metabolna aktivacija → tvorba ROS zaradi elektronskega premika → disfunkcija mitohondrijev → nadaljnja tvorba ROS zaradi premika elektronov elektronskega premika). Živo srebro se namreč veže z encimskimi kompleksi v mitohondrijih, ki sodelujejo v dihalni verigi, in povzroči njihovo disfunkcijo (12).

Antioksidanti obrambni sistem, ki sodeluje pri obrambi v primeru izpostavljenosti Hg^{2+} in MeHg^+ , je glutationski sistem. Glutation-redoksn sistem sestavljata encima glutation peroksidaza (GSH-Px) in glutation reduktaza (GR) ter njun substrat, GSH. Encima katalizirata redukcijo vodikovega peroksida in organskih peroksidov do vode, pri čemer pride do oksidacije GSH, ki se pri tem pretvori v dimerno oksidirano obliko (GSSG). Sledi regeneracija reducirane oblike GSH, ki jo katalizira glutation reduktaza. GR je posredno povezan z odstranjevanjem ROS in igra pomembno vlogo pri regeneraciji GSH, s čimer

zagotavlja nemoteno katalitično delovanje GSH-Px (15). GSH je tripeptid, ki vsebuje tiolno skupino in se v večini nahaja v mitohondrijih, citosolu in v jedru. Sestavljen je iz glutaminske kisline, cisteina in glicina (4,17). Ob izpostavitvi oksidativnemu stresu nastajajo GSH konjugati ter GSSG (18). GSH konjugat nastane, ko elektrofilne funkcionalne skupine kot so epoksidi, sulfonati, sulfidi ter radikali reagirajo s tiolno skupino GSH. Omenjeni konjugat se nato lahko pretvori v merkapturno kislino (19). GSH ima pomembno vlogo v številnih celičnih procesih, vključno s celično diferenciacijo, proliferacijo ter apoptozo v primeru motenj GSH homeostaze. Pomanjkanje in neravnovesje GSH vpliva na dovzetnost za oksidativni stres in nastanek nekaterih bolezni (rak, Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen) (18).

Visoke koncentracije MeHg^+ povzročijo izčrpavanje GSH in s tem se antioksidantna obramba zmanjša (20). Vezava živega srebra na SH-skupine GSH in cisteina torej znižuje vsebnost GSH v astrocitih in zmanjša prenos cisteina v nevrone. V kolikor ne pride do prevzema cisteina iz astrocitov, se GSH ne more sintetizirati, kar pa poveča občutljivost nevronov na delovanje živega srebra in oksidativni stres. V razvojnem obdobju ploda živo srebro zaradi vezave na SH-skupine zavira sintezo beljakovin ter polimerizacijo tubulov, ki je pomembna za rast živčnih vlaken in dendritov, ter povzroča spremembe v mitohondrijih. Poleg tega živo srebro poveča tvorbo vodikovega peroksida, kisikovih in drugih radikalov ter sproža oksidativni stres. Oksidativni stres pa povzroča peroksidacijo lipidov ter nukleotidnih baz, motnje v prepustnosti celične membrane in homeostaze kalcija v celici, prizadetost in celo apoptozo nekaterih celic in nevronov, moti pa tudi delovanje živčnih prenašalcev ter povzroča motnje v delovanju imunskega sistema (21).

1.2.3. Vpliv ROS na nosečnice in razvoj ploda ter transport snovi preko placente

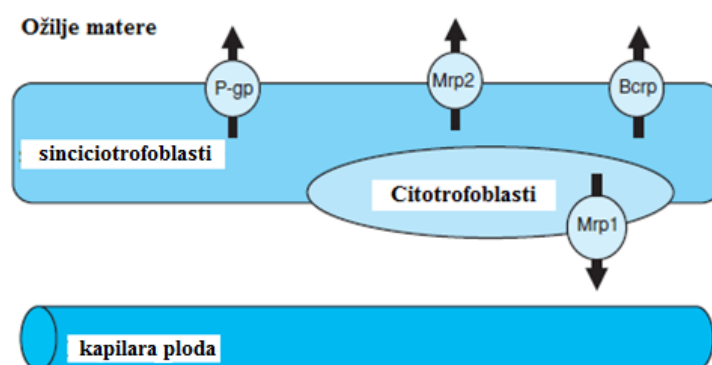
Nosečnost je fiziološko stanje povišanega oksidativnega stresa, do katerega pride zaradi povečane metabolne aktivnosti in zmanjšanega delovanja antioksidantov. Njegov obseg je odvisen od tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti ter od učinkovitosti antioksidantnega sistema. V nosečnosti ROS sodelujejo pri signalnih poteh ženskega reprodukativnega cikla, saj so pomembne v procesu folikulogeneze, zorenju oocita, pri delovanju rumenega telesca in miometrija, v procesu embriogeneze, implantacije zarodka in tudi pri fetoplacentarnem

razvoju. Motnje oksidativnega ravnotežja v nosečnosti lahko vodijo v nastanek motenj v razvoju zarodka in kasneje ploda, saj prekomerni oksidativni stres povzroči oksidativno okvaro bioloških molekul (14). Pri nosečnicah je zelo pomemben toksičen vpliv na plod, saj je plod v primerjavi z odraslimi, zaradi nizke teže in večje porabe hrane na kilogram telesne teže, bistveno bolj ogrožen. Ugotovljeno je bilo, da je živo srebro eden izmed vzrokov za pojav epilepsije ter avtizma, pri otrocih pa zmanjšuje tudi inteligenčni kvocient. Živo srebro se pri plodu kopiči v hipofizi, ki vpliva na žleze z notranjim izločanjem in hipotalamus - kar pa pomeni vpliv na encimsko ter hormonsko delovanje in na prenos glukoze (6).

Posteljica predstavlja povezavo med materjo ter plodom (22). Je večnamenski organ, ki omogoča zaščito ploda, izmenjavo plinov v krvnem obtoku matere in ploda, odstranjuje odpadne snovi in sodeluje pri sintezi hormonov (23). Preko posteljice snovi prehajajo s pomočjo različnih mehanizmov, in sicer s pomočjo pasivne difuzije, aktivnega transporta in pinocitoze (22). Hranilne snovi, ki so potrebne za razvoj ploda, prehajajo s pomočjo aktivnega transporta. Te snovi so vitamini, aminokisliline, kalcijevi in železovi ioni ter sladkorji. Toksične spojine pa v večini prehajajo enostavnejše, in sicer s pomočjo pasivne difuzije. Koncentracija snovi, ki prehajajo s pasivno difuzijo, je zaradi dinamičnega ravnovesja v večini enaka pri materi in plodu. Prehod preko posteljice je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti spojin. Te lastnosti so molekulska masa, lipofilnost, topnost, stopnja ionizacije ter vezava na beljakovine. Znano je, da različne oblike živega srebra različno prehajajo. MeHg^+ in Hg^0 preko posteljice prehajata lažje, medtem ko je prehod Hg^{2+} otežen in prehaja le takrat, ko je prisoten v visokih koncentracijah. MeHg^+ prehaja preko posteljice kot cisteinski konjugat z aminokislinami (cistein, fenilalanin) (24).

Morfološka struktura posteljice je zapletena, saj jo sestavlja več plasti celic. Omenjene plasti se razlikujejo glede na obdobje nosečnosti. Posteljico tvorita dve pomembni plasti, in sicer apikalna plast sinciotrofoblastov in bazolateralna plast citotrofoblastov (Slika 5). Plast sinciotrofoblastov se nahaja na zunanem delu in predstavlja stik z materjo. Medtem ko se plast citotrofoblastov nahaja na notranjem delu posteljice in predstavlja stik s plodovim krvnim obtokom. Toksini morajo torej uspešno preiti preko obeh plasti do

plodovega endotelija kapilar. Prenašalci, ki sodelujejo pri tem prehodu, so P-gp, Mrp2 in Bcrp na apikalnem ter Mrp1 na bazolateralnem delu posteljice. Omenjeni prenašalci igrajo pomembno vlogo pri zaščiti ploda, saj omejujejo prehod škodljivih snovi. (23) Bcrp je rezistenten protein izoliran iz raka dojk, ki se zelo intenzivno izraža v posteljici. Študije so dokazale povezavo med povečanjem izražanja tega proteina in zmanjšanim prehodom substratov preko posteljice do ploda. Bcrp torej otežuje prehod toksičnih snovi preko plasti sinciotrofoblastov in omogoča obojesmerno črpanje toksičnih snovi (v in iz posteljice) (25). Mrp2 je protein, ki je povezan z rezistenco na več spojin tipa 2. Ima pomembno vlogo pri preprečevanju prehoda konjugiranih metabolitov toksičnih snovi preko posteljice. Ti konjugirani metaboliti so lipofilni konjugati - v povezavi z živim srebrom je to cisteinski konjugat (26). P-gp je P-glikoprotein, katerega intenzivno izražanje v posteljici je bilo dokazano na ravni mRNA in proteinov. Ima pomembno vlogo pri zaščiti ploda, saj ima zmožnost črpanja toksičnih snovi iz plasti sinciotrofoblastov nazaj v materin krvni obtok (27). Mrp1 je protein, ki je povezan z rezistenco na več spojin tipa 1. Njegova glavna naloga je omejiti transport organskih kationov (v našem primeru MeHg^+ in Hg^{2+}) v zarodkov krvni obtok (23).



Slika 5: Zgradba posteljice (23)

Bcrp je rezistenten protein izoliran iz raka dojk, P-gp je P-glikoprotein, Mrp1 je protein, ki je povezan z rezistenco na več spojin tipa 1, Mrp2 je protein, ki je povezan z rezistenco na več spojin tipa 2.

1.3. Glutation S-transferaza

Glutation S-transferaze so družina encimov, ki predstavljajo endogeni del obrambnega mehanizma proti reaktivnim kisikovim zvrstem. Katalizirajo reakcijo konjugacije toksičnih

spojin z GSH. Nahajajo se v citosolu in mikrosomalni ter mitohondrijski celični frakciji. GST so prisotne v večini tkiv, v najvišjih koncentracijah pa v jetrih, črevesju, ledvicah, testisih, nadledvični žlezi in pljučih. GST v citosolu so dimeri, ki so običajno sestavljeni iz identičnih podenot (Mr 23-29 kDa). Vsaka podenota vsebuje od 199 do 244 aminokislin. GST v mitohondriju so ravno tako dimeri, vsaka podenota pa vsebuje 226 aminokislin. Mikrosomalne GST se od omenjenih razlikujejo v sposobnosti tvorbe agregatov. Za poimenovanje encimov so morali številne podenote klonirati in jim določiti sekvenco. Vsakemu encimu so dodelili dvomestno številko. V kolikor je encim homodimer iz podenot 1 in 2, so ga poimenovali 1-1 in 2-2. Če pa je encim heterodimer, so ga poimenovali 1-2. Heterodimeri ter homodimeri se razlikujejo v načinu cepitve vezi (28).

Omenjena družina encimov poveča ionizacijo tiolne skupine GSH, s čimer se poveča nukleofilnost, kar omogoča konjugacijo s potencialno škodljivimi elektrofilni. Na ta način pride do zaščite nukleofilnih centrov proteinov ter nukleinskih kislin v celicah (29). Substrati za konjugacijo z GSH so množica elektrofilnih spojin in spojin, ki se lahko biotransformirajo v elektrofilno obliko. Pri reakciji konjugacije z GSH gre za nukleofilni napad glutation-tiolatnega aniona (GS⁻) na elektrofilni atom ogljika. Substrate, ki so vključeni v konjugacijo z GSH, torej lahko razdelimo v dve skupini. V prvi skupini so spojine, ki so elektrofilni, v drugi pa tiste spojine, ki se lahko metabolizirajo v elektrofilne spojine. V drugo skupino spadajo reaktivni intermediati, ki nastanejo med konjugacijo, in sicer epoksidi, dušikovi ter ogljikovi ioni ter prosti radikali. Reakcija konjugacije lahko poteka na dva načina, in sicer z reakcijo nukleofilne substitucije ter adicije. Pri substituciji GSH zamenja elektron privlačno skupino ter povzroči premik elektronov, pri adiciji pa se GSH veže v napet obroč in razcepi dvojno vez. Do substitucije pride, ko substrati vsebujejo elektron privlačno skupino, ki je vezana na ogljikov atom v benzenskem obroču (28,30). Po konjugaciji se nato elektrofilne spojine izločijo. Reakcija konjugacije je reakcija razstrupljanja (29).

Ta družina encimov ima v organizmu še vrsto drugih funkcij, in sicer razgradnjo aromatskih aminokislin, sintezo steroidnih hormonov in modulacijo signalnih poti. GSH je tudi kofaktor za GSH-Px, ki ima pomembno vlogo pri zaščiti celic pred peroksidacijo

lipidov in hemoglobina. Zaščitni mehanizem pred toksičnimi spojinami je pogosto povezan s prekomerno ekspresijo gena za skupino encimov glutathion transferaz (28).

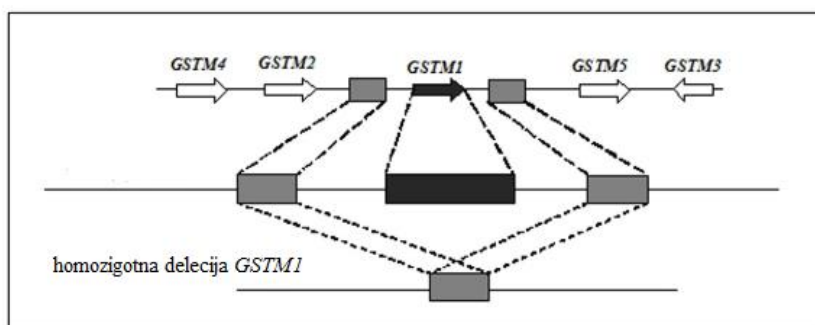
1.3.1. GSTM1 in GSTT1

Encim GST spada v multigensko družino izoencimov (31). Poznamo osem družin GST, in sicer α (A), μ (M), π (P), ω (O), Θ (T), ζ (Z), σ (S), κ (K). Encim obstaja v homodimerni in heterodimerni obliki, kar mu daje možnost reakcije z različnimi substrati. GST je encim, ki je vezan na membrano in je v visokih količinah prisoten v ledvicah (4). Glede nato, da mikrosomalna glutationska transferaza ne ustreza tem osmim razredom, je moč sklepati, da se je sintetizirala neodvisno. Poznamo jih šest, razdelimo pa jih v tri skupine. Med seboj se razlikujejo v sposobnosti tvorbe agregatov. Konjugacijo spojin z GSH katalizirajo encimi vseh osmih razredov, razlika med njimi je v specifičnih substratih. Ti substrati pa največkrat sprožijo delovanje GST (vodikov peroksid, reaktivne kisikove spojine). Pri tem se poveča izražanje mRNA, ki kodira podenoto *GST* (28). Aktivacija gena *GST* je regulirana s transkripcijskim faktorjem Nrf2 (angl. nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2). Nrf2 je protein, ki se veže na promotorsko regijo ARE gena *GST* in se aktivira z nastankom presežne količine ROS v celicah (32).

Pri človeku se izražajo encimi vseh razredov, opisana pa bosta le dva, ki sta predmet magistrske naloge, in sicer encima razreda M in T, GSTM1 in GSTT1.

Pri ljudeh se izraža pet podenot, ki spadajo v razred M, in sicer *GSTM1* - *GSTM5*. Geni *GSTM* so dolgi 100 kb in se nahajajo na 1. kromosomu na mestu p13.3. Geni *GSTM1*, *GSTM3* in *GSTM4* so zelo polimorfni. Alelni različici *GSTM1**A in *GSTM1**B se razlikujeta le za eno aminokislino. *GSTM1**A ima na koncu 173 lizin, medtem ko ima *GSTM1**B asparagin in deluje kislo. Poleg alelnih različic se pojavljata tudi delecija (*0) in duplikacija alela (*1x2). V genu *GSTM1* poznamo homologno in heterologno delecijo. Gen *GSTM1* se nahaja med *GSTM2* in *GSTM5*. V kolikor je prisotna homozigotna delecija, pride do izrezovanja gena *GSTM1* (Slika 6) in encim GSTM1 popolnoma izgubi aktivnost. V kolikor pa je prisotna heterozigotna delecija, ima encim GSTM1 manjšo aktivnost (28, 33). GSTM1 je homodimerni encim, v večini se nahaja v citoplazmi jetrnih celic in je

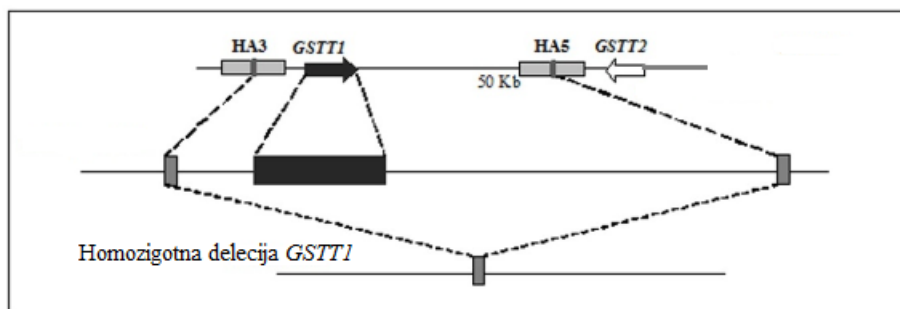
sestavljeno iz 218 aminokislin. Glavna substrata za GSTM1 sta nitrozourea ter učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje rakavih obolenj (31,34).



Slika 6: Homozigotna delecija *GSTM1*

GSTM1 je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu1. *GSTM2* je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu2. *GSTM3* je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu3. *GSTM4* je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu4. *GSTM5* je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu5.

Izražata se tudi dve podenoti razreda T, in sicer *GSTT1* in *GSTT2*. Geni se nahajajo na 22. kromosomu na mestu q11.23. Gen *GSTT1* je ravno tako polimorfen. Obstajata 2 alelni različici *GSTT1**A in *GSTT1**B, pri čemer je prišlo do nukleotidne substitucije 310A>C. *GSTT1**A in *GSTT1**B se razlikujeta le za eno aminokislino, in sicer *GSTT1**A ima na 104. mestu aminokislinski ostanek treonina, medtem ko ima *GSTT1**B aminokislinski ostanek prolina. Omenjena zamenjava aminokislinske ima velik vpliv na aktivnost encima, saj prolin moti pravilno zvijanje proteina. V študiji je bilo dokazano, da je aktivnost encima GSTT1 pri tistih posameznikih, ki imajo alelni različico *GSTT1**A, dvakrat višja od tistih, ki imajo alelni različico *GSTT1**B (35). Poleg alelnih različic se pojavljata tudi delecija (*0) in duplikacija alela (*1x2). V genu *GSTT1* poznamo homologno in heterologno delecijo. Gen *GSTT1* se nahaja med HA3 in HA5. V kolikor je prisotna homozigotna delecija, pride do izrezovanja gena *GSTT1* (Slika 7) in encim GSTT1 popolnoma izgubi aktivnost. V kolikor pa je prisotna heterozigotna delecija, ima encim GSTT1 manjšo aktivnost (28,33). Neka pilotna študija je poročala o povezavi med polimorfizmi gena *GSTT1* in povečanjem označevalcev peroksidacije lipidov ter pojavom vnetja pri kadilcih v povezavi z boleznimi srca in ožilja (36). GSTT1 je homodimerni encim, nahaja se v citoplazmi in je sestavljen iz 240 aminokislin. GSTT1 lahko presnavlja manjše organske molekule (31,37).

Slika 7: Homozigotna delecija *GSTT1*

GSTT1 je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza theta1. *GSTT2* je gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza theta2. HA3 in HA5 sta gena, ki nosita zapis za protein hemaglutinin.

1.3.2. Genski polimorfizmi povezani s presnovo Hg^{2+} in MeHg^+

V literaturi je predstavljeno, da so nekateri genski polimorfizmi antioksidantnih encimov povezani s presnovo živega srebra (Preglednica II). Polimorfizmi vplivajo na shranjevanje in presnovo živega srebra, kar lahko spremeni koncentracijo prisotne toksične spojine v telesu. Polimorfizmov, povezanih z geni *GST*, ki kodirajo sintezo encimov GST, je veliko. Kot primer lahko navedem polimorfizem *GST* razreda P (*GSTP1*), ki ima v podatkovni bazi NCBI znanih 158 SNP. Znana je povezava med polimorfizmom *GST* razreda P (*GSTP1*, rs1138272) in višjimi vsebnostmi živega srebra v eritrocitih. Pri tem polimorfizmu gre za zamenjavo nukleotida C>T, kar pomeni, da se aminokislina alanin na 114. mestu zamenja z valinom. Genski modifikator podenote glutamil-cistein ligaze (GCLM) dokazuje polimorfizem promotorja (rs41303970), kar vpliva na sintezo GSH. Pri tem polimorfizmu gre na mestu 588 za zamenjavo nukleotida C>T. Znano je, da imajo nosilci alela T višjo raven vsebnosti živega srebra v primerjavi s tistimi, ki so nosilci alela C (38).

V literaturi pogosto omenjeni polimorfizmi, povezani z genom *GSTM* in *GSTT* so delecija v genu *GSTM1* in nukleotidna zamenjava *GSTM3-224* (G>A) ter delecija v genu *GSTT1*. Homozigotna delecija v genih *GSTM1* in *GSTT1* - genotip *0 povzroči izgubo aktivne oblike encima. Heterozigotna delecija v genih *GSTM1* in *GSTT1* pa povzroči zmanjšano aktivnost encima. Obe omenjeni deleciji pa vplivata na zmanjšano konjugacijo toksičnih snovi. Omenjeno rezultira v počasnejšem izločanju živega srebra. V kolikor je konjugacija

zmanjšana, so v organizmu prisotne višje koncentracije toksičnih snovi, kar ima citotoksične posledice (39,40).

Preglednica II: Genski polimorfizmi antioksidantnih encimov povezani s presnovo živega srebra (38)

GEN	ALELI	SNP	FUNKCIJA
<i>GSTP1</i>	A>G	105 Ile>Val	105 Val ↓ katalitična aktivnost
<i>GSTP1</i>	C>T	114 Ala>Val	114 Val ↓ katalitična aktivnost
<i>GCLM</i>	C>T	5' konec	T ↓ aktivnost promotorja
<i>SEPP1</i>	C>T	234 Ala>Thr	Thr ↓ 60kDa
<i>SEPP1</i>	C>T	3'UTR	C ↓ izražanje
<i>GSTT1</i>	+>-	delecija	↓ katalitična aktivnost
<i>GPX1</i>	C>T	200 Pro>Leu	200 Leu ↓ aktivnost
<i>GPX4</i>	C>T	3'UTR	T ↓ izražanje
<i>GCLC</i>	G>A	5' konec	A ↓ aktivnost promotorja
<i>GSTM1</i>	+>-	delecija	↓ katalitična aktivnost
<i>GSTM3</i>	G>T	5'UTR	/
<i>GGT1</i>	T>C	intron	/
<i>GCLC</i>	G>A	5' konec	A ↓ aktivnost promotorja
<i>GSTM3</i>	G>A	224 Val>Ile	224 Val ↓ katalitična aktivnost
<i>GSS</i>	C>G	5' konec	/
<i>GSR</i>	G>T	5' konec	/
<i>GSR</i>	T>A	intron	/

3'UTR - neprevedena regija na 3'koncu, 5'UTR - neprevedena regija na 5'koncu, A - adenin, Ala - alanin, C - citozin, G - gvanin, Ile - izolevcin, kDa - enota za maso proteinov (kilo daltonov), Leu - levcin, Pro - prolin, T - timin, Val - valin, Thr - treonin, *SEPP1* - gen, ki nosi zapis za selenoprotein 1, *GCLC* - gen, ki nosi zapis za encim glutamat-cistein ligaza, *GCLM* - genski modifikator podenote glutamil-cistein ligaze, *GGT1* - gen, ki nosi zapis za encim gama-glutamyltransferaza 1, *GPX1* - gen, ki nosi zapis za encim glutation preroksidaza 1, *GPX4* - gen, ki nosi zapis za encim glutation preroksidaza 4, *GSS* - gen, ki nosi zapis za encim glutation sintetaza, *GSTM1* - gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu1, *GSTM3* - gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza mu3, *GSTT1* gen, ki nosi zapis

za encim glutation S-transferaza theta1, *GSTP1*- gen, ki nosi zapis za encim glutation S-transferaza pi1, *GSR* - gen, ki nosi zapis za encim glutation reduktaza.

Na presnovo živega srebra poleg polimorfizmov genov *GST* vplivajo tudi polimorfizmi genov *MT*. Ti geni kodirajo metalotionein, ki spada v skupino manjših proteinov, ki vežejo cistein in toksične snovi - živo srebro. Polimorfizmi *MT* se nahajajo na regiji, ki je pomembna za regulacijo transkripcije. Pri človeku je znano izražanje 4 oblik teh proteinov in sicer MT1, MT2, MT3 in MT4. V literaturi so navedeni številni genotipi, in sicer MT2A (G>C), MT1M (T>C in G>A), MT1G (G>T), MT1E (G>T) in MTF1 (G>A in T>C) (41).

2. Namen dela

Živo srebro in njegove spojine, še posebej metil-živo srebro, imajo nevrotoksičen vpliv na človeški organizem. Novorojenčki so lahko že prenatalno izpostavljeni živemu srebru in metiliranemu živemu srebru ter je njihov toksičen vpliv zaradi prehoda preko posteljice in nato še preko krvno-možgansko pregrade še posebej nevaren. Metabolizem omenjenih spojin poteka s pomočjo encimov glutationskega in tioredoksinskega sistema. V magistrski nalogi se bomo osredotočili na encime glutationskega sistema in možne delecije, ki bi lahko vplivali na metabolizem živega srebra in njegovih derivatov.

Namen magistrskega dela je raziskati vpliv delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* na koncentracije Hg^{2+} in MeHg^+ v krvi matere, popkovnični krvi ploda in urinu otroka. Raziskali bomo tudi povezanost z morebitno nevrotoksičnostjo pri otrocih v 18. mesecu starosti.

Genske delecije bomo analizirali s pomočjo tripleksne metode z verižno reakcijo s polimerazo ter z agarozno gelsko elektroforezo. Rezultati bodo statistično ovrednoteni s pomočjo programa SPSS.

Hipoteza:

Obstaja vzročno-posledična povezava med delecijama v genih *GSTM1* ter *GSTT1* in nevrotoksičnostjo pri novorojenčkih, ki so bili prenatalno izpostavljeni živemu srebru in metiliranemu živemu srebru.

3. Materiali in metode

3.1. Preiskovanci

Preiskovana populacija, ki smo jo vključili v raziskovanje, so nosečnice in otroci iz Hrvaške ter otroci iz Slovenije. Število nosečnic iz Hrvaške je bilo 212, otrok pa 165. Število otrok iz Slovenije pa je bilo 405. Skupaj je bilo torej 212 vzorcev nosečnic ter 575 vzorcev otrok. Nosečnicam so na kontrolnih pregledih odvzeli vzorec periferne venske krvi v Kliničkem bolniškem centru Klinike za ginekologijo in porodništvo v Reki ter jih do nadaljnjih analiz hranili pri temperaturi -20°C . Ob porodu so odvzeli vzorec popkovnične krvi ter tkivne vzorce popkovine in jih do nadaljnjih analiz hranili pri temperaturi -20°C . Od preiskovank so pridobili tudi podatke o starosti ter količini zaužitih rib. Vse preiskovanke so pred pričetkom študije podale soglasje o vključitvi svojih vzorcev v študijo. Študija je bila odobrena s strani etične komisije obeh vključenih držav.

3.2. Vzorci

3.2.1. Določanje vsebnosti živega srebra in metil-živega srebra

Shranjeni vzorci so bili transportirani na Inštitut Jožef Štefan, kjer so jim določili vsebnost Hg^{2+} in MeHg^{+} .

Koncentracijo živega srebra v krvi matere, v urinu otroka ter v popkovnični krvi so določili s pomočjo atomske absorpcijske spektroskopije (AAS) na Odseku za okoljske znanosti, Inštitut Jožef Štefan. Metoda temelji na merjenju absorbirane svetlobe, s specifično valovno dolžino, ki jo absorbira element v atomskem stanju. Pred detekcijo je potrebno vzorec upariti ter ga atomizirati. Vse meritve so bile izmerjene na analizatorju Direct Mercury Analyzer (Milestone Srl, Italija).

Koncentracija MeHg^{+} v popkovnični krvi ter venski krvi nosečnic so določili s pomočjo ekstrakcije, etilacije, ločitve s plinsko kromatografijo ter detekcije z atomsko fluorescenčno spektroskopijo hladnih par. Vse meritve so bile izmerjene na analizatorju CV-AFS Brooks Rand Labs (Model 1), ZDA.

3.2.2. Izolacija nukleinskih kislin

Genomska DNK je bila pri nosečnicah izolirana iz levkocitov periferne venske krvi s kompletom High Pure PCR Template Preparation Kit proizvajalca Roche. Genomska DNK novorojenčkov je bila izolirana iz popkovničnega tkiva s kompletom QIAamp DNA Mini Kit proizvajalca QIAGEN, ZDA.

3.3. Delecije v genih *GSTM1* in *GSTT1*

3.3.1. Tripleksna verižna reakcija s polimerazo

3.3.1.1. Princip

Tripleksna verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki temelji na *in vitro* pomnoževanju treh specifičnih odsekov DNK. Za potek reakcije so potrebni matrična DNK, 3 pari začetnih oligonukleotidov, pufer, magnezijevi ioni (Mg^{2+}), deoksinukleotid trifosfati (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) in termostabilna DNK polimeraza. Najpogosteje uporabljena termostabilna DNK polimeraza je Taq polimeraza, ki je izolirana iz termofilnega organizma *Thermus aquaticus*. Taq polimeraza ima optimalno aktivnost pri 72°C, kratek čas pa je obstojna tudi pri 95°C. Reakcijo sestavljajo tri stopnje, in sicer denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov in ciklično pomnoževanje ter podaljševanje verige. Z omenjeno reakcijo smo istočasno pomnoževali 3 specifične odseke DNK (gen *GPXI*, gen *GSTM1* in gen *GSTT1*) s 3 pari oligonukleotidnih začetnikov, kar prikazuje Preglednica III.

3.3.1.2. Reagenti

- raztopina $MgCl_2$ (1,5mL; 25mM, Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- pufer (10X PCR Gold Buffer $MgCl_2$; 1,5mL; 25mm; Applied Biosystem, Roche, ZDA); sestava: 500mM KCl, 150mM Tris-HCl; pH 8,0 (pri sobni temperaturi)
- DNK polimeraza AmpliTaq GoldTM, 5U/ μ L (Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- Deoksiribonukleozid trifosfat, 2mM (10 μ L posamezne raztopine dATP, dGTP, dTTP, dCTP koncentracije 100mM razredčene z 460 μ L ultra čiste vode)

- avtoklavirana ultra čista voda (pripravljena z aparatom LabWater Purelab Classic UF, Elga, Velika Britanija)
- vzorec DNK (delovna raztopina iz izolata)

Preglednica III: Začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukletid	Koncentracija	Zaporedje
istosmerni začetni oligonukleotid GPX1-F	5mM	5' - AGCCCAACTTCATGCTCTTC - 3'
obratnosmerni začetni oligonukleotid GPX1-R	5mM	5' - AGATGTGAGGACCAGTAAGG - 3
istosmerni začetni oligonukleotid GSTM1-F	5mM	5' - GCTTCACGTGTTATGGAGGTT - 3'
obratnosmerni začetni nukleotid GSTM1-R	5mM	5' - CGGGAGATGAAGTCCTTCAGA - 3
istosmerni začetni oligonukleotid GSTT1-F	5mM	5' - ATGTGACCCTGCAGTTGC - 3'
obratnosmerni začetni oligonukleotid GSTT1-R	5mM	5' - AGATGTGAGGACCAGTAAGG- 3'

3.3.1.3. Oprema in aparature

- laboratorijska halja (Deloza, Slovenija)
- lateksne laboratorijske rokavice brez pudra (Kimtech, ZDA)
- nitrilne laboratorijske rokavice brez pudra (Kimtech, ZDA)
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra (10 μ L; 200 μ L; 1mL; Sarstadt, Nemčija)
- avtoklav (Steriltechnik AG, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epice s pokrovčkom (0,5mL in 1,5 mL; Sarstadt, Nemčija)
- delovna komora za PCR (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner, Latvija)

- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μ L; 2-20 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L; Eppendorf, Nemčija)
- plastični vsebniki s cevko, napolnjeni z etanolom in natrijevim hipokloritom,
- krpice (Paloma, Slovenija)
- stojala
- Flomaster (Staedtler permanent, Nemčija)
- centrifuga (Cambi Spin FVL-2400N, Biosan, Latvija)
- centrifuga (Centric 322A, Tehnica, Slovenija)
- PCR aparat (PeQlab, Nemčija)

3.3.1.4. Postopek dela

Pri verižni reakcije s polimerazo je potrebno paziti na morebitne kontaminacije reakcijske zmesi s tujo DNK. Kontaminacija je odvisna od načina dela in okolja, v katerem reakcijske zmesi pripravljamo. Ves čas dela smo uporabljali lateksne rokavice in jih pogosto menjavali. V izogib kontaminacijam smo reakcijsko zmes pripravljali v delovni PCR komori v atmosferi s filtriranim zrakom. Pred pričetkom dela smo notranjost komore najprej očistili z 10% etanolom, nato pa še s 3% raztopino natrijevega hipoklorita. Na enak način smo očistili ves ostali pribor ter ga izpostavili še UV-sevanju za 30 minut. Pripravili smo 30-60 kratno količino reakcijske zmesi po navodilih v Preglednici IV. V vsako epico smo odpipetirali 19 μ L reakcijske zmesi in 1 μ L vzorca DNK. Pripravili smo tudi negativno kontrolo (slepa vzorca), ki smo ji namesto vzorca DNK, dodali 1 μ L avtoklavirane ultra čiste vode. Negativna kontrola služi dokazovanju odsotnosti kontaminacije s tujo DNK. Količino posameznih reagentov in vzorca za PCR reakcijo enega vzorca prikazuje Preglednica IV. Vsako epico smo dobro zaprli, jo premešali na vorteksu ter centrifugirali. Po centrifugiranju smo epice pazljivo prenesli v PCR aparat PeQlab, na katerem smo nastavili optimiziran program (TRIPLEX-1) - glej spodnjo Preglednico V.

Preglednica IV: Reagenti za tripleksno PCR reakcijo

REAGENT	KOLIČINA REAGENTA (μL)
Raztopina MgCl ₂ (25mM)	2
dNTP (2mM)	4
Pufer 10x	2
Istosmerni začetni oligonukleotid GPX1-F	1,5
Obratnosmerni začetni oligonukleotid GPX1-R	1,5
Istosmerni začetni oligonukleotid GSTM1-F	1,5
Obratnosmerni začetni oligonukleotid GSTM1-R	1,5
Istosmerni začetni oligonukleotid GSTT1-F	1,5
Obratnosmerni začetni oligonukleotid GSTT1-R	1,5
Avtoklavirana ultra čista voda	1,7
Taq polimeraza	0,3
Vzorec DNK	1
Končni volumen	20

DNK - deoksiribonukleinska kislina, dNTP - deoksiribonukleotidtrifosfat

Preglednica V: Pogoji tripleksne PCR reakcije

Stopnja reakcije	Temperatura	Čas
Segrevanje	95°C	10 min
Denaturacija	95°C	1 min
Prileganje	61°C	1 min
Podaljšanje	72°C	1 min
Končno podaljšanje	72°C	8 min
Ohlajanje	8°C	∞

40x

V zgoraj omenjeni tripleksni PCR reakciji smo pomnoževali odseke genov *GSTM1*, *GSTT1* in *GPXI*. *GPXI* predstavlja interno pozitivno kontrolo. V primeru, da se *GPXI* ni pomnožil, smo reakcijo obravnavali kot neuspešno in potrebno jo je bilo ponoviti. Za

uspešnost reakcije je bilo potrebno izbrati ustrezna zaporedja začetnih oligonukleotidov. Njihove lastnosti so prikazane v spodnji Preglednici VI.

Preglednica VI: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov

Oligonukleotidni začetnik	Dolžina (bp)	Delež GC (%)
GSTM1-F (5' - GCTTCACGTGTTATGGAGGTT - 3')	21 bp	48%
GSTM1-R (5' - CGGGAGATGAAGTCCTTCAGA - 3')	21 bp	52%
GSTT1-F (5' - ATGTGACCCTGCAGTTGC - 3')	18 bp	55%
GSTT1-R (5' - AGATGTGAGGACCAGTAAGG - 3')	20 bp	50%
GPX1-F (5' - AGCCCAACTTCATGCTCTTC - 3')	20 bp	50%
GPX1-R (5' - AGATGTGAGGACCAGTAAGG - 3')	20 bp	50%

S temi začetnimi oligonukleotidi smo pomnoževali odseke genov *GPX1* (dolžine 400 bp), *GSTM1* (dolžine 154 bp) (Slika 8) ter *GSTT1* (dolžine 69 bp) (Slika 9). Uspešnost tripleksne PCR reakcije in prisotnost delecij smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo, ki je opisana v naslednjem poglavju.

```
GCTTCACGTGTTATGGAGGTTCCAGCCCACATATTCTTGGCCTTCTGCAGATCACTTTTGTAGAT
TTTCTCGTCTATGATGTCCTTGACCTCCACCGTATAATTTGAGCCC
AAGTGCTTGACGCCTTCCCAAATCTGAAGGACTTCATCTCCCG
```

Slika 8: Odsek gena *GSTM1*, ki se pomnožuje v reakciji PCR

```
ATGTGACCCTGCAGTTGCTCGAGGACAAGTTCCTCCAGAACAAGGCCTTCTTACTGGTCCTCA
CATCT
```

Slika 9: Odsek gena *GSTT1*, ki se pomnožuje v reakciji PCR

3.3.2. Agarozna elektroforeza

3.3.2.1. Princip

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Nabiti delci potujejo proti elektrodi z nasprotnim nabojem. Uporabljali smo

elektroforezo na agarozem gelu, ki nam omogoča ločevanje molekul DNK na osnovi velikosti in je enostaven za uporabo (42) .

3.3.2.2. Reagenti

- agarosa (Agarose Sigma Adrich, ZDA)
- pufer 1xTAE (0,098 M Tris-HCl; 0,089 M boriva kislina; 0,002 M EDTA)
- ultra čista voda (pripravljena z aparatom LabWater Purelab Classic UF, Elga, Velika Britanija)
- SYBR Safe (Invitrogen, ZDA)
- nanašalni pufer (0,35% glicerola, 0,0023% ksilencianola)
- označevalec velikosti DNK (fragmanti: 50 bp, 150 bp, 300 bp, 500 bp, 750 bp in 1000 bp; PCR Markers G316A, ZDA)

3.3.2.3. Oprema in aparature

- laboratorijska halja (Deloza, Slovenija)
- lateksne laboratorijske rokavice brez pudra (Kimtech, ZDA)
- nitrilne laboratorijske rokavice brez pudra (Kimtech, ZDA)
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra (10 μ L; 200 μ L, Sarstadt, Nemčija)
- avtoklav (Steriltechnik AG, Nemčija)
- polavtomatske pipete (2-20 μ L; 20-200 μ L; Eppendorf, Nemčija)
- plastični vsebniki s cevko, napolnjeni z destilirano vodo
- krpice (Paloma, Slovenija)
- erlenmajerica (250mL; Duran, Nemčija)
- plastična žlica,
- elektronska tehtnica (Kern EW 620-3NM, Nemčija)
- merilni valj (100mL; Duran, Nemčija)
- urno steklo
- mikrovalovna pečica (OptiQuick, Nemčija)

- prijemalka za vročo steklovino
- kapalka
- nosilec za gel
- glavnički
- digestorij (Waldner Electronics FAZ1, Nemčija)
- parafilm (Sealing Film 100mm x 75mm, ZDA)
- kadička za elektroforezo (BIO-RAD WIDE MINI-SUB CELL GT, ZDA)
- vir napetosti (BIO-RAD PowerPac Basic, ZDA)
- računalnik s programsko opremo (HP, GeneSnap in GeneTools)
- G-komora za slikanje gelov (G:Box, Velika Britanija)

3.3.2.4. Postopek dela

Agarozno elektroforezo smo izvajali na 2% agaroznem gelu. Za pripravo gela smo natehtali 1,5g agaroze, dodali 75mL 1xTAE pufra ter vsebino segrevali toliko časa, da je postala bistra in tekoča raztopina (1-2 min). V rahlo ohlajeno raztopino agaroze smo odpipetirali 6 μ L barvila SYBR Safe, jo premešali ter ulili v pripravljen nosilec z glavnički. V raztopini smo zaradi potencialne interference pri potovanju nabitih delcev odstranili morebitne mehurčke, ki so nastali med ulivanjem v nosilec. Gel smo zaščitili pred svetlobo ter ga pustili strjevati približno 30 minut. V nadaljevanju smo za vsak vzorec na parafilm nanesli 4 μ L nanašalnega pufra, ki vsebuje glicerol ter ksilencianol. Glicerol poveča gostoto in omogoča lažje usedanje vzorcev in PCR markerja v žepke gela. Ksilencianol pa obarva vzorce in omogoča prikaz hitrosti potovanja DNK fragmentov. Na parafilm, kamor smo predhodno nanesli nanašalni pufer, smo nato dodali 4 μ L PCR markerja, vzorce ter slepi vzorec. Vsak vzorec, marker ter slepi vzorec smo s pipeto posebej dobro premešali ter nanesli v posamezen žepček na gelu. Elektroforeza je potekala 25 minut pri napetosti 90V. Po končani elektroforezi smo gel previdno prenesli v G:Box komoro ter ga slikali. Posnetek smo s pomočjo računalniškega programa shranili ter označili lokacijo lis.

Detekcija je bila mogoča zaradi uporabe fluorescentnega barvila SYBR Safe, ki se vrine (interkalira) v dvo-verižno DNK. Interkalirane molekule DNK fluorescirajo močneje kot

proste molekule barvila. Pri rokovanju s tem barvilom moramo biti posebej pazljivi, saj je mutagen in karcinogen. Pri delu moramo zato uporabljati posebne zaščitne nitrilne rokavice.

3.4. Statistične metode

Rezultate smo statistično analizirali in ovrednotili s pomočjo statističnega programa SPSS Statistics 20. V analizi smo uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test). Uporaba ustreznih testov je bila odvisna od normalnosti porazdelitve spremenljivk.

S pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa smo testirali normalnost porazdelitve spremenljivk. V primeru, ko so p-vrednosti večje od 0,05, se spremenljivke porazdeljujejo normalno. V kolikor pa so p-vrednosti manjše od 0,05, spremenljivke najprej logaritmiramo, nato pa te logaritmirane vrednosti ponovno testiramo. Če so p-vrednosti teh logaritmiranih vrednosti večje od 0,05, se te spremenljivke porazdeljujejo normalno in pri nadaljnjih analizah uporabljamo logaritmirane vrednosti. V kolikor pa so p-vrednosti še vedno manjša od 0,05, se spremenljivke porazdeljujejo nenormalno in v nadaljnjih analizah uporabljamo nelogaritmirane vrednosti.


S testom ANOVA smo testirali povezanost spremenljivk, ki se porazdeljujejo normalno. S pomočjo testa ANCOVA smo testirali povezanost spremenljivk, ki se porazdeljujejo normalno z upoštevanjem kovariat. Vrednosti $p < 0,05$ so pomenile statistično značilne razlike, medtem ko so vrednosti $p > 0,05$ pomenile odsotnost statistično značilne razlike.

Spremenljivke, ki se porazdeljujejo nenormalno, smo testirali s pomočjo Kruskal-Wallisovega testa. Preverjali smo povezanost delecij v genih *GSTM1* ter *GSTT1* in izbranih spremenljivk. Vrednosti $p < 0,05$ so pomenile statistično značilne razlike, medtem ko so vrednosti $p > 0,05$ pomenile odsotnost statistično značilne razlike.

4. Rezultati in razprava

4.1. Optimizacija tripleksne PCR reakcije

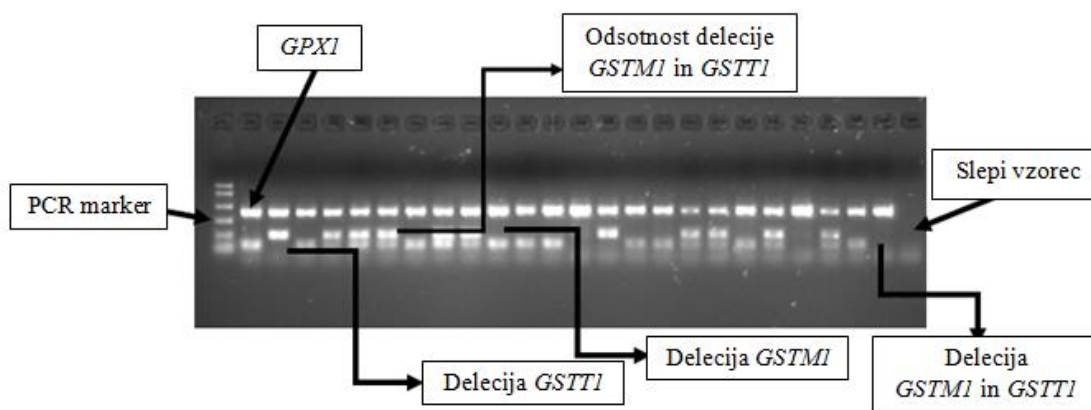
Na uspešnost izvedbe tripleksne PCR reakcije lahko vpliva več dejavnikov. Poleg zgoraj omenjene morebitne kontaminacije s tujo DNK lahko vpliva še količina Mg ionov, dNTP, Taq polimeraze, količina oligonukleotidnih začetnikov in DNK ter reakcijski pogoji PCR. Sestavo reakcijske zmesi smo povzeli po diplomski nalogi Vpliv genskih delecij *GSTMI* in *GSTTI* na mineralno kostno gostoto (Maja Petrovič). Optimizirali smo le pogoje reakcije, pri katerih smo genske fragmente pomnoževali, saj smo pri delu uporabili PCR aparat drugega proizvajalca (BIO-RAD, C1000 Thermal Cycler). Naša izhodišča so bila priporočila proizvajalca reagentov ter pregledana literatura. Pri prvi reakciji smo uporabili naslednje pogoje:

- ✚ T segrevanja = 95°C, 10 minut
 - ✚ T denaturacije = 95°C, 1 minuta
 - ✚ T prileganja = 57°C, 1 minuta
 - ✚ T podaljševanja = 72°C, 1 minuta
 - ✚ T končnega podaljševanja = 72°C, 1 minuta
 - ✚ T ohlajanja = 8°C, ∞
- 
- 35x

Uspešnost prve reakcije smo preverili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze pri napetosti 90V 20 minut. Na 2% agarozni gel smo nanesti 4μL nanašalnega pufra in 4μL vzorca. Namen elektroforeze je bila jasna prepoznava tarčnih odsekov DNK. Po končani prvi elektroforezi smo opazili nekoliko nejasne lise ter se lotili optimizacije reakcije in elektroforeze. Optimizacijo reakcije smo naredili s pomočjo cikličnega pomnoževalnika (C1000 Thermal Cycler), kamor smo vstavili 8 epic reakcijske zmesi. Ciklični pomnoževalnik nam omogoča določitev optimalne T prileganja, saj lahko nastavimo 8 različnih temperatur. Po končanem pomnoževanju smo vzorce prenesli na agarozni gel in nastavili pogoje elektroforeze. Glede nato, da smo opazili nejasne lise, smo čas elektroforeze podaljšali na 25 minut. Po končani elektroforezi smo ugotovili, da so lise najboljše vidne pri T prileganja 61°C. V nadaljevanju smo spremenili še število ciklov na

40x. Vse nadaljnje reakcije smo nato izvedli pri pogojih, ki so navedeni v poglavjih 3.3.1.4. in 3.3.2.4.

Različno dolgi odseki genov so različno hitro potovali. Najpočasneje je potoval 400 bp dolg odsek gena *GPXI*, ki je potrdil uspešnost pomnoževanja. V kolikor se odsek *GPXI* ni pomnožil in lisa ni bila vidna, smo reakcijo smatrali kot neuspešno in smo jo morali ponoviti. Nekoliko hitreje je potoval 154 bp dolg odsek gena *GSTM1*. Pri vzorcih, ko se odsek *GSTM1* ni pomnožil in ni bilo vidne lise, je bila v genu prisotna delecija. Najhitreje pa je potoval najkrajši odsek gena, in sicer 69 bp dolg odsek gena *GSTT1*, ki je bil tudi najšibkejše viden na gelu. Pri vzorcih, ko se odsek *GSTT1* ni pomnožil in ni bilo vidne lise, je bila v genu prisotna delecija (Slika 10). Vidnost lise je pomenila tako heterozigotne kot homozigotne nosilce alelov, saj jih nismo uspeli ločiti.



Slika 10: Prikaz produktov tripleksne PCR reakcije na agaroznem gelu

Prisotnost lise dolžine 69 bp je pomenila heterozigotno ($GSTT1/GSTT1^*$) in homozigotno ($GSTT1/GSTT1$) prisotnost gena *GSTT1*. Odsotnost lise dolžine 69 bp je pomenila delecijo v genu ($GSTT1^*/GSTT1^*$). Ravno tako je prisotnost lise dolžine 154 bp pomenila heterozigotno ($GSTM1/GSTM1^*$) in homozigotno ($GSTM1/GSTM1$) prisotnost gena *GSTM1*. Odsotnost lise dolžine 154 bp je pomenila delecijo v genu ($GSTM1^*/GSTM1^*$). V primeru, ko na agaroznem gelu ni bilo vidnih lis dolgih 69 bp in 154 bp, smo določili prisotnost delecije v obeh genih ($GSTM1^*$ in $GSTT1^*$) (Slika 10). Rezultati genotipizacije so prikazani v Preglednici XXVI in Preglednici XXVII v poglavju 7.

Obravnavali smo jih posamezno ter v kombinaciji. Zaradi statistične obdelave podatkov smo jim pripisali vrednosti 0, 1, 2 in 3, katerih pomen je opisan v poglavju 4.2.

4.2. Značilnosti preiskovane populacije

V raziskavo smo vključili 212 nosečnic iz Hrvaške ter 575 novorojenčkov iz Slovenije in Hrvaške. Vsi preiskovanci so bili del evropskega projekta PHIME (angl. Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata). V okviru tega projekta smo želeli oceniti vpliv dolgotrajne izpostavljenosti nizkim količinam toksičnih kovin pri občutljivejših skupinah populacije (nosečnice in otroci). Lastnosti preiskovank smo prikazali v Preglednici XXII v poglavju 7. V tej preglednici so prikazane lastnosti preiskovane populacije nosečnic iz Hrvaške, in sicer starost, kadilski status, ITM, količina zaužitih rib v enem tednu, koncentracije Hg^{2+} in MeHg^+ v krvi matere, popkovnični krvi, laseh, urinu ter mleku. V Preglednici XXIII (poglavje 7) so prikazane koncentracije Hg^{2+} in MeHg^+ , izmerjene v urinu hrvaških novorojenčkov. Preglednica XXIV (poglavje 7) pa opisuje lastnosti mater iz Slovenije, in sicer količino zaužitih rib ter koncentracije Hg^{2+} v laseh, popkovnični krvi in mleku.

Pogostost delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* v celotni preiskovani populaciji je prikazana v Preglednici XXV (priloga 7). V nadaljevanju smo v poglavje 7 priložili še rezultate genotipizacije hrvaških in slovenskih vzorcev (Preglednica XXVI in Preglednica XXVII). Rezultatom genotipizacije smo zaradi statistične obdelave podatkov pripisali vrednosti 0,1,2 in 3. Omenjena števila pomenijo:

✚ Stolpec *GSTM1* in *GSTT1*:

- 0 = delecija ni prisotna,
- 1 = delecija je prisotna,

✚ Stolpec kombinacija:

- 0 = delecija ni prisotna,
- 1 = delecija je prisotna pri *GSTM1* in odsotna pri *GSTT1*,
- 2 = delecija je prisotna pri *GSTT1* in odsotna pri *GSTM1*,
- 3 = deleciji *GSTM1* in *GSTT1* sta prisotni.

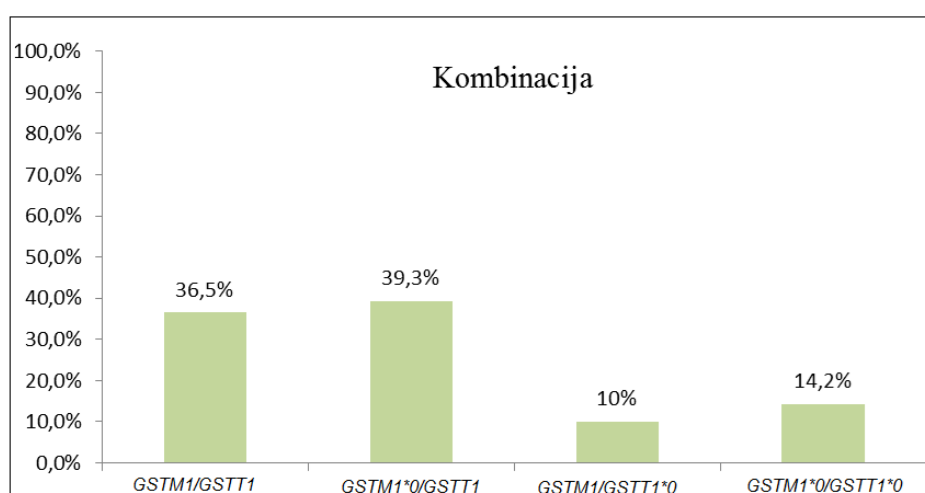
4.3. Klinični pomen genetskih sprememb v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri izpostavljenosti toksičnim vplivom Hg^{2+} in $MeHg^+$

Želeli smo dokazati povezavo med delecijami v genih *GSTM1* in *GSTT1* in koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter morebitnimi nevrotoksičnimi posledicami otrok. Nevrotoksične posledice smo opredelili s pomočjo vrednosti COG, LANG in MOT. Vrednosti COG, MOT in LANG predstavljajo osnovne sposobnosti zdravega človeka. Vrednosti COG predstavljajo kognitivne (miselne) sposobnosti, vrednosti LANG predstavljajo retorične (govorne) sposobnosti in vrednosti MOT predstavljajo motorične (gibalne) sposobnosti otrok. Te vrednosti so nam posredovali specialisti nevrologi iz Pediatrične klinike, UKC Ljubljana, ki so jih pridobili s pomočjo kliničnih pregledov in Bayley-eve lestvice.

4.3.1. Pogostost delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri hrvaških vzorcih

Preglednica VII: Pogostost delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri nosečnicah

Gen	Št. vzorcev (N)	Delež prisotne delecije	Delež odsotne delecije
<i>GSTM1</i>	211	53,6 %	46,4 %
<i>GSTT1</i>	211	24,2 %	75,8 %
<i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	211	14,2 %	36,5 %

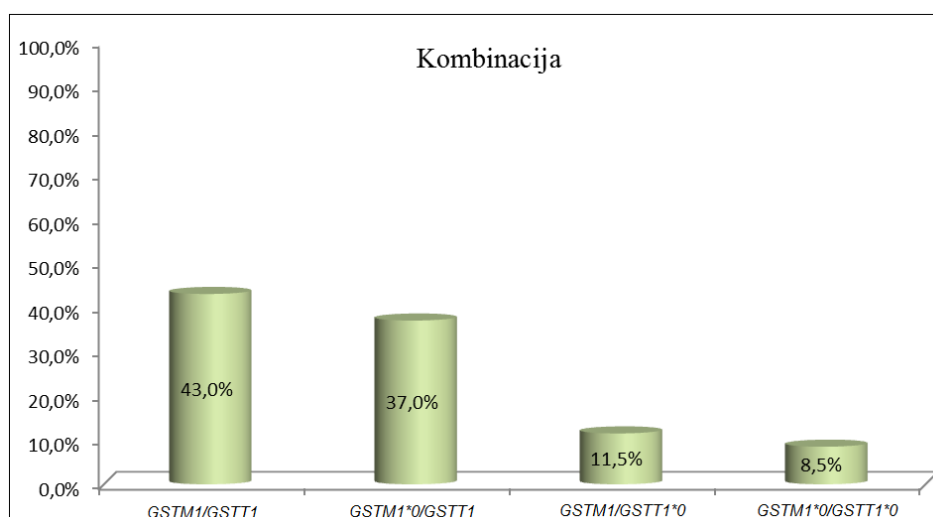


Graf 1: Pogostost kombinacij delecij v obeh genih pri hrvaških nosečnicah

GSTM1/GSTT1 pomeni prisotnost obeh genov. *GSTM1*0/GSTT1* pomeni prisotnost gena *GSTT1* in odsotnost gena *GSTM1* (delecija). *GSTM1/GSTT1*0* pomeni prisotnost gena *GSTM1* in odsotnost gena *GSTT1* (delecija). *GSTM1*0/GSTT1*0* pa pomeni odsotnost obeh genov (delecija).

Preglednica VIII: Pogostost delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri otrocih

Gen	Št. vzorcev (N)	Delež prisotne delecije	Delež odsotne delecije
<i>GSTM1</i>	165	46,1 %	53,9 %
<i>GSTT1</i>	165	19,4 %	80,6 %
<i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	165	8,5 %	43,0 %



Graf 2: Pogostost kombinacij delecij v obeh genih pri hrvaških novorojenčkih

GSTM1/GSTT1 pomeni prisotnost obeh genov. *GSTM1*0/GSTT1* pomeni prisotnost gena *GSTT1* in odsotnost gena *GSTM1* (delecija). *GSTM1/GSTT1*0* pomeni prisotnost gena *GSTM1* in odsotnost gena *GSTT1* (delecija). *GSTM1*0/GSTT1*0* pa pomeni odsotnost obeh genov (delecija).

Iz Preglednic VII in VIII je razvidno, da se delež prisotnih delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* v populaciji nosečnic ter novorojenčkov razlikuje. Opazili smo, da se delecije v genih *GSTM1* in *GSTT1* 1,2-krat pogosteje pojavljajo v populaciji nosečnic kot v populaciji novorojenčkov. Pogostost delecij v obeh genih je v populaciji dokaj nizka, pri čemer pa smo zopet opazili večjo pogostost delecij pri populaciji nosečnic. Iz tega bi lahko sklepali, da je pogostost delecij v obeh genih višja pri ženskah kot pri moških, saj moramo upoštevati dejstvo, da so novorojenčki pol dednega materiala podedovali od očetov. Ko

smo med seboj primerjali pogostost kombinacij delecij v obeh genih, smo v celotni populaciji hrvaških preiskovancev ugotovili bistveno večji delež prisotnih delecij v genu *GSTMI* (38,1%).

V literaturi smo poiskali podatke o pogostosti delecij v obeh genih pri Kavkazijcih in jih primerjali z našimi rezultati (Preglednica IX). Ko smo primerjali pogostost delecij v obeh genih, smo ugotovili podobnost naših rezultatov z omenjeno raziskavo. Ugotovili smo, da se v populacijah pogosteje pojavljajo delecije v genu *GSTMI* (okrog 50%) kot pa delecije v genu *GSTTI* (okrog 20%).

Preglednica IX: Pogostost delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI* pri Kavkazijcih in pri hrvaških preiskovancih vključenih v našo raziskavo (43)

Delecija v genu	% prisotne delecije pri Kavkazijcih	% prisotne delecije pri hrvaških preiskovancih
<i>GSTMI</i>	53,1%	49,9%
<i>GSTTI</i>	19,7%	21,8%
<i>GSTMI</i> in <i>GSTTI</i>	10,4%	11,4%

4.3.2. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu *GSTTI*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih

Delecija v genu *GSTTI* je eden izmed dveh preučevanih polimorfizmov, ki smo jih testirali v povezavi s koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter z nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih. Statistične analize smo se lotili tako, da smo najprej s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa preverili normalnost porazdelitve. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

Postavili smo dve hipotezi in nato določili statistično značilne povezave/vplive. Hipotezi sta sledeči:

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **je prisotna**.

S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

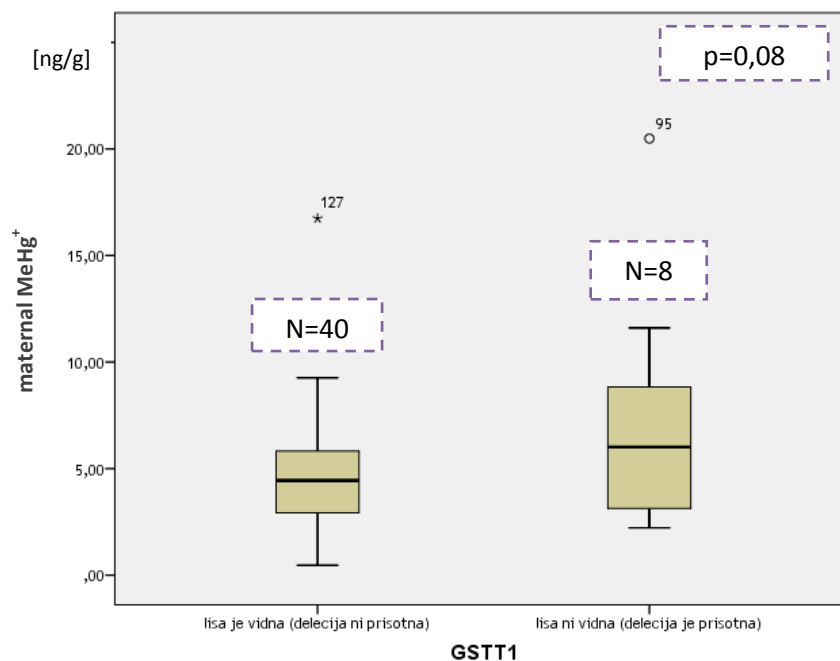
Preglednica X: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri nosečnicah za gen *GSTT1*

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In maternal Hg^{2+} (kri matere)	ANOVA	0,49	210	H_0
Maternal $MeHg^+$ (kri matere)	ANOVA	0,08	48	H_a
In cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,38	195	H_0
In cord $MeHg^+$ (popkovnična kri)	ANOVA	0,03	44	H_a
Babyurine Hg^{2+} (urin otroka)	Kruskal-Wallis test	0,66	31	H_0
COG	ANOVA	0,67	150	H_0
LANG	ANOVA	1,00	150	H_0
MOT	ANOVA	0,91	150	H_0

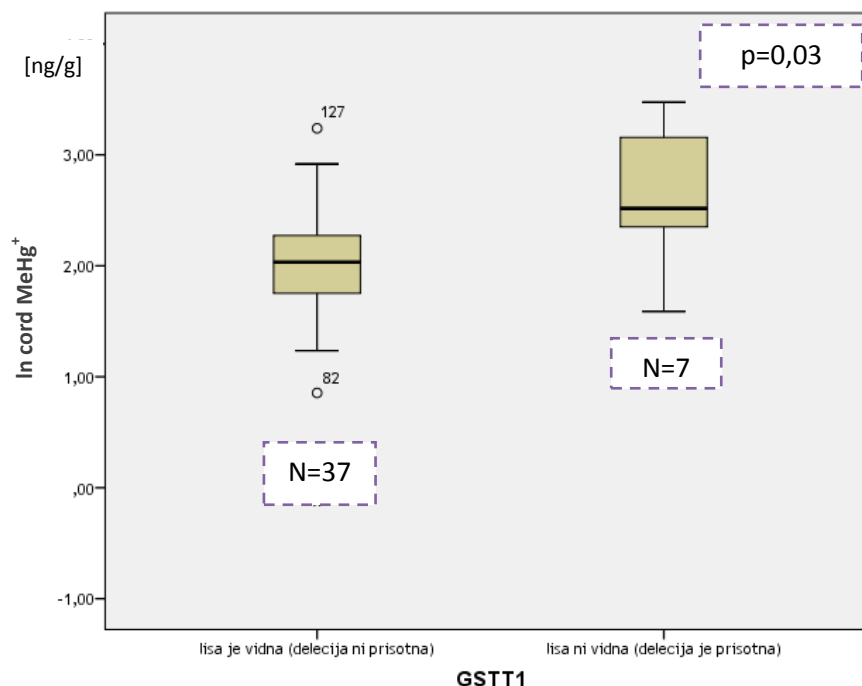
Besedilo obravnavo vijolično in krepko pomeni (mejno) statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

P-vrednost pri testiranju parametra In cord $MeHg^+$ (popkovnična kri) je bila manjša od 0,05, zato smo zavrgli H_0 in sprejeli H_a . Pri tej analizi smo torej ugotovili statistično značilno povezavo med delecijo v genu *GSTT1* in koncentracijo $MeHg^+$ v popkovnični krvi ($p=0,03$, Graf 4). P-vrednosti, ki so bile med 0,05 in 0,1 smo obravnavali kot mejno statistično značilne. Ugotovili smo mejno statistično značilno povezavo med delecijo v genu *GSTT1* in koncentracijo $MeHg^+$ v krvi matere ($p=0,08$, Graf 3). Pri tistih testih

ANOVA, kjer smo dobili statistično značilne in mejno statistično značilne povezave/vplive, smo v nadaljevanju naredili še test ANCOVA. Pri tem smo upoštevali dejstvo, da na statistično značilen vpliv, ki jih dajo testi ANOVA, lahko vplivajo tudi kovariate. Z ANCOVA izključimo vpliv kovariat in preverimo, če še vedno obstaja statistično značilna povezava/vpliv. Kovariati, ki smo ju testirali sta \ln total fish (količina zaužitih rib) ($p_{\text{ancova}}=0,03$) in \ln milk Hg^{2+} (koncentracija Hg^{2+} v mleku) ($p_{\text{ancova}}=0,01$). Kovariati sta neodvisni spremenljivki, koncentracije MeHg^+ v krvi matere in koncentracije MeHg^+ v popkovnični krvi pa sta odvisni spremenljivki. S testom ANCOVA smo torej potrdili (mejno) statistično značilno povezanost med delecijo v genu *GSTT1* in koncentracijo MeHg^+ v popkovnični krvi ter koncentracijo MeHg^+ v krvi matere.



Graf 3: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg^+ v krvi mater povezane z delecijo v genu *GSTT1*



Graf 4: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg⁺ v popkovnični krvi povezane z delecijo v genu *GSTT1*

Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1* in povišanimi koncentracijami MeHg⁺ v krvi matere ter povišanimi koncentracijami MeHg⁺ v popkovnični krvi. Ta ugotovitev je v skladu z našo hipotezo, saj je aktivnost encima GSTT1 zaradi prisotne delecije v genu *GSTT1* odsotna ali zmanjšana. Posledica odsotne ali zmanjšane aktivnosti encima GSTT1 je manjša konjugacija in večje kopičenje MeHg⁺ v tkivih.

Težava pri interpretaciji teh rezultatov, ki se je moramo zavedati, je zelo majhno število v analizo vključenih preiskovank. Zaradi tega dejstva je moč statistične analize zelo majhna. Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate bi morali v analizo vključiti večje število preiskovank. Zaradi omenjene težave pri moči statistične analize sem v literaturi našla podatke, ki potrjujejo naše ugotovitve. V raziskavi so namreč dokazali statistično značilno povezavo med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1* in povišanimi koncentracijami MeHg⁺ v krvi matere ter povišanimi koncentracijami MeHg⁺ v popkovnični krvi (44).

Preglednica XI: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za gen *GSTT1*

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In maternal Hg ²⁺ (kri matere)	ANOVA	0,19	165	H ₀
Maternal MeHg ⁺ (kri matere)	ANOVA	0,41	35	H ₀
In cord Hg ²⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,20	158	H ₀
In cord MeHg ⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,46	36	H ₀
Babyurine Hg ²⁺ (urin otroka)	Kruskal-Wallis test	0,12	34	H ₀
COG	ANOVA	0,50	120	H ₀
LANG	ANOVA	0,94	120	H ₀
MOT	ANOVA	0,73	120	H ₀

Kratice COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratice LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratice MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H₀ pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

Pri otrocih je slika nekoliko drugačna, saj lahko pri vseh zgoraj testiranih parametrih zavržemo H_a in privzamemo, da velja H₀ (Preglednica XI). Torej statistično značilne povezave med delecijo v genu *GSTT1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi matere, popkovnični krvi in urinu otroka ter nevrotoksičnostjo otrok pri vzorcih otrok nismo uspeli dokazati.

4.3.3. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu *GSTM1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih

Delecija v genu *GSTM1* je drugi preučevani polimorfizem, ki smo ga testirali v povezavi s koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter z nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih. Pred statistično analizo parametrov smo najprej preverili normalnost porazdelitve s Kolmogorov-Smirnovim testom. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

Postavili smo dve hipotezi, in sicer ničelno ter alternativno ter nato določili statistično značilne povezave/vplive.

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTM1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTM1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **je prisotna**.

S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

Preglednica XII: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri nosečnicah za gen *GSTM1*

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
ln maternal Hg^{2+} (kri matere)	ANOVA	0,91	210	H_0
Maternal $MeHg^+$ (kri matere)	ANOVA	0,43	48	H_0
ln cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,87	195	H_0
ln cord $MeHg^+$ (popkovnična kri)	ANOVA	0,94	44	H_0
Babyurine Hg^{2+} (urin otroka)	Kruskal-Wallis test	0,24	31	H_0
COG	ANOVA	0,94	150	H_0
LANG	ANOVA	0,76	150	H_0
MOT	ANOVA	0,84	150	H_0

Kratice COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratice LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratice MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

Preglednica XIII: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za gen *GSTM1*

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In maternal Hg ²⁺ (kri matere)	ANOVA	0,72	165	H ₀
Maternal MeHg ⁺ (kri matere)	ANOVA	0,43	35	H ₀
In cord Hg ²⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,89	158	H ₀
In cord MeHg ⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,30	36	H ₀
Babyurine Hg ²⁺ (urin otroka)	Kruskal-Wallis test	0,93	37	H ₀
COG	ANOVA	0,37	120	H ₀
LANG	ANOVA	0,67	120	H ₀
MOT	ANOVA	0,87	120	H ₀

Kratice COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratice LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratice MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H₀ pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

Iz Preglednic XII in XIII je razvidno, da lahko pri vseh testiranih parametrih zavržemo H_a in privzamemo, da velja H₀. Torej statistično značilne povezave med delecijo v genu *GSTM1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi matere, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih nismo uspeli dokazati.

4.3.4. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* ter *GSTT1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih

V tem poglavju bomo diskutirali o povezavi med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih. Statistične analize smo se lotili po ustaljenem postopku. Najprej smo s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa preverili normalnost porazdelitve. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

V nadaljevanju smo postavili dve hipotezi in nato določili statistično značilne povezave/vplive. Hipotezi sta ničelna in alternativna.

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **je prisotna**.

S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

Preglednica XIV: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri nosečnicah za kombinacijo delecij v obeh genih

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In maternal Hg^{2+} (kri matere)	ANOVA	0,42	210	H_0
Maternal $MeHg^+$ (kri matere)	ANOVA	0,23	48	H_0
In cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,29	195	H_0
In cord $MeHg^+$ (popkovnična kri)	ANOVA	0,09	44	H_a
Babyurine Hg^{2+} (urin otroka)	Kruskal-Wallis test	0,98	31	H_0
COG	ANOVA	0,97	150	H_0
LANG	ANOVA	0,86	150	H_0
MOT	ANOVA	0,69	150	H_0

Besedilo obarvano vijolično in krepko pomeni mejno statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

P-vrednosti, ki so se nahajale v intervalu od 0,05 do 0,1, smo obravnavali kot mejno statistično značilno. Ugotovili smo mejno statistično značilno povezavo med prisotnimi

kombinacijami delecij v obeh genih in koncentracijami MeHg⁺ v popkovnični krvi (p=0,09). V nadaljevanju smo s testom ANCOVA preverili še vpliv kovariate ln hair MeHg⁺ (koncentracija MeHg⁺ v laseh) (p_{ancova}=0,22) in ugotovili, da je statistično značilna povezava prisotna zaradi vpliva kovariate. Ob upoštevanju kovariate smo ugotovili, da ni statistično značilne povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI* ter koncentracijami MeHg⁺ v popkovnični krvi. Pri interpretaciji zgoraj navedenih rezultatov imamo težavo s številom vzorcev. Zaradi zelo majhnega števila vzorcev imamo nizko statistično moč analize, zato rezultatov ne moremo ustrezno ovrednotiti in interpretirati. Poleg tega je statistična moč še nižja pri upoštevanju kovariat. Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate, bi morali v analizo vključiti večje število vzorcev oziroma pridobiti popolnejše rezultate testov, kar predlagam za bodoče raziskave.

Preglednica XV: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za kombinacijo delecij v obeh genih

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
ln maternal Hg ²⁺ (kri matere)	ANOVA	0,43	165	H ₀
Maternal MeHg ⁺ (kri matere)	ANOVA	0,70	35	H ₀
ln cord Hg ²⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,40	158	H ₀
ln cord MeHg ⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,91	36	H ₀
Babyurine Hg²⁺ (urin otroka)	Kruskal-Wallis test	0,07	37	Ha
COG	ANOVA	0,62	120	H ₀
LANG	ANOVA	0,70	120	H ₀
MOT	ANOVA	0,98	120	H ₀

Besedilo obarvano vijolično in krepko pomeni mejno statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H₀ pomeni ničelno hipotezo, Ha pa alternativno hipotezo.

Kot sem že omenila, smo p-vrednosti, ki so se nahajale v intervalu od 0,05 do 0,1, obravnavali kot mejno statistično značilne. Ugotovili smo mejno statistično značilno povezavo med prisotnostjo kombinacij delecij v obeh genih in koncentracijami Hg²⁺ v

urinu otrok ($p=0,07$). V nadaljevanju smo s testom ANCOVA preverili še vpliv kovariate ln total fish (količina zaužitih rib) ($p_{\text{ancova}}=0,28$) in ugotovili, da je statistično značilna povezava prisotna zaradi vpliva kovariate. Ob upoštevanju kovariate smo ugotovili, da ni statistično značilne povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI* ter koncentracijami Hg^{2+} v urinu otrok. Pri interpretaciji zgoraj navedenih rezultatov imamo težavo s številom vzorcev. Zaradi zelo majhnega števila vzorcev imamo nizko statistično moč analize, zato rezultatov ne moremo ustrezno ovrednotiti in interpretirati. Poleg tega je statistična moč še nižja pri upoštevanju kovariat. Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate, bi morali v analizo vključiti večje število vzorcev oziroma pridobiti popolnejše rezultate testov, kar predlagam za bodoče raziskave.

4.3.5. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* ter *GSTTI* pri materah in otrocih (po parih), koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih

Z dvosmerno ANOVO smo želeli preveriti povezavo med genotipi mater in otrok po parih, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter posledično nevrotoksičnostjo otrok. V nadaljevanju smo postavili dve hipotezi in nato določili statistično značilne povezave/vplive. Hipotezi sta ničelna in alternativna.

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI* pri materah in otrocih (po parih), koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI* pri materah in otrocih (po parih), koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških vzorcih **je prisotna**.

S pomočjo dvosmerne ANOVE smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

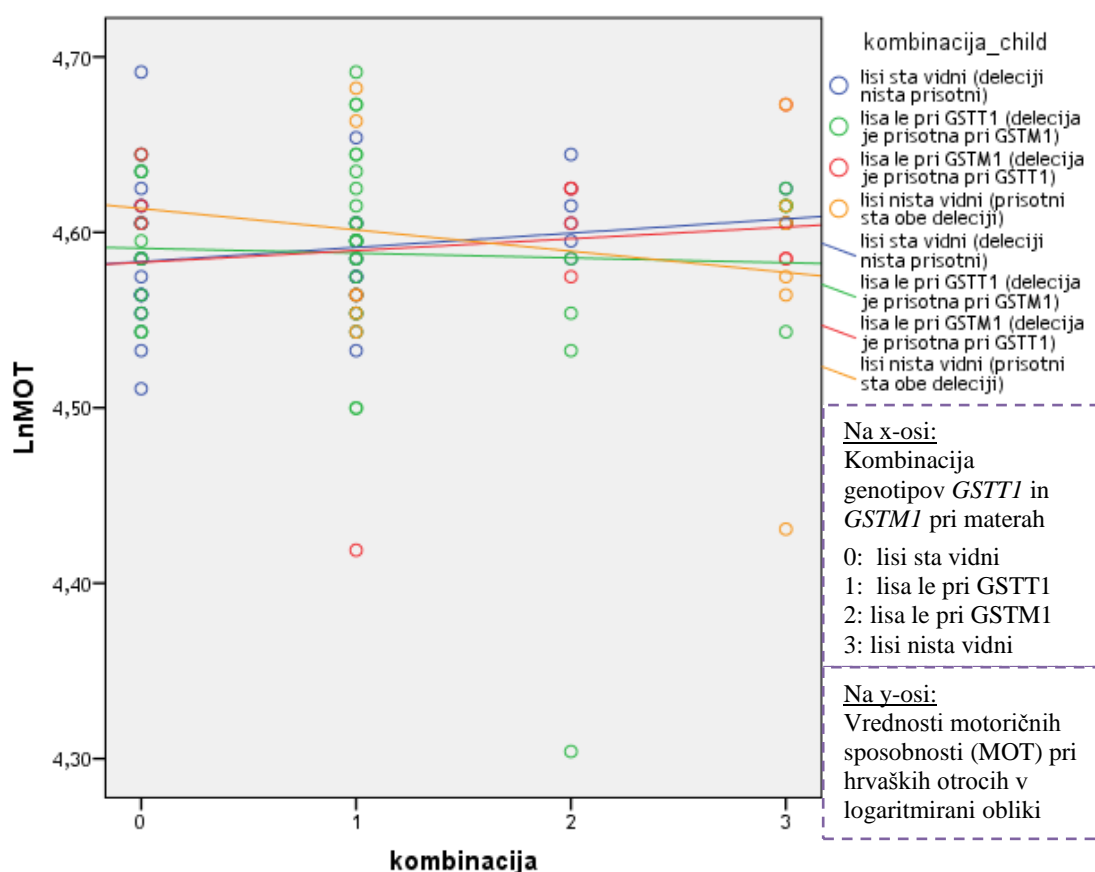
Iz Preglednice XVI lahko vidimo, da statistično značilna povezava med prisotnimi kombinacijami delecij v obeh genih pri materah in otrocih (po parih) ter koncentracijami Hg^{2+} in MeHg v popkovnični krvi ne obstaja. Obstaja pa statistično značilna povezava med

prisotnimi kombinacijami delecij v obeh genih pri materah in otrocih (po parih) ter nevrološki lastnostmi, natančneje motoričnimi sposobnostmi (MOT) ($p=0,01$, Graf 5).

Preglednica XVI: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri materah in otrocih za kombinacijo delecij v obeh genih

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,25	195	H_0
In cord $MeHg^+$ (popkovnična kri)	ANOVA	0,15	48	H_0
COG	ANOVA	0,11	120	H_0
LANG	ANOVA	0,50	120	H_0
MOT	ANOVA	0,01	120	Ha

Besedilo obarvano vijolično in krepko pomeni statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.



Graf 5: Odvisnost vrednosti LnMOT od kombinacije genotipov mater in otrok

V Grafu 5 so zaradi lepšega prikaza uporabljene logaritmirane vrednosti MOT (lnMOT). Iz grafa lahko razberemo trend padanja vrednosti lnMOT otrok v povezavi s prisotnostjo delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri materah in otrocih. Glede nato bi lahko sklepali, da obstaja povezava med prisotnima delecijama in zmanjšanimi nevrološkimi motoričnimi funkcijami otrok.

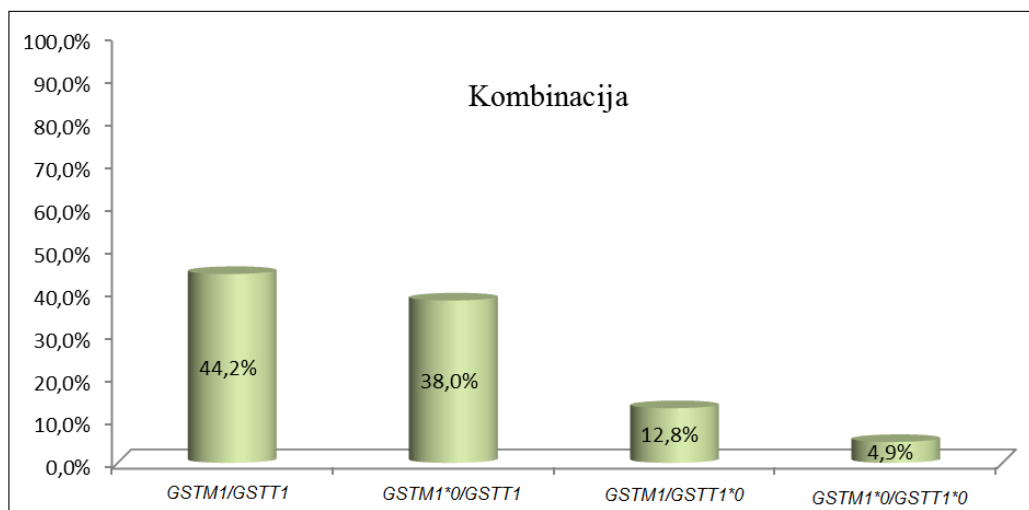
V prejšnjih poglavjih smo testirali povezavo med prisotnostjo kombinacij delecij v genu *GSTM1* in *GSTT1* pri materah in otrocih posebej, pri čemer smo opazili ločene povezave med prisotnimi kombinacijami delecij in povišanimi koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi. Pri tem pa nismo uspeli dokazati ločene povezave med prisotnimi kombinacijami delecij in znižanimi vrednostmi nevroloških testov.

Menim, da bi bilo v prihodnje smiselno povečati moč statistične analize in natančneje raziskati povezavo med vsemi tremi dejavniki skupaj, in sicer med genotipi mater in otrok, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v različnih bioloških vzorcih in vrednostmi nevroloških testov (MOT, LANG, COG).

4.3.6. Pogostost delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri slovenskih vzorcih

Preglednica XVII: Pogostost delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1* pri otrocih

Gen	Št. vzorcev (N)	Delež prisotne delecije	Delež odsotne delecije
<i>GSTM1</i>	405	43,5 %	56,5 %
<i>GSTT1</i>	405	17,8 %	82,2 %
<i>GSTM1</i> in <i>GSTT1</i>	405	4,9 %	44,2 %



Graf 6: Pogostost kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*

GSTM1/GSTT1 pomeni prisotnost obeh genov. *GSTM1*0/GSTT1* pomeni prisotnost gena *GSTT1* in odsotnost gena *GSTM1* (delecija). *GSTM1/GSTT1*0* pomeni prisotnost gena *GSTM1* in odsotnost gena *GSTT1* (delecija). *GSTM1*0/GSTT1*0* pa pomeni odsotnost obeh genov(delecija).

Iz Preglednice XVII je razvidno, da se v populaciji novorojenčkov delecije v genu *GSTM1* v primerjavi z delecijo v genu *GSTT1* 2,4-krat pogosteje pojavljajo. Pogostost prisotnih delecij v obeh genih je zelo nizka (4,9%). Opazili smo, da je v populaciji najpogosteje prisotna kombinacija delecije v genu *GSTM1* in odsotnost delecije v genu *GSTT1* (38,0%) (Graf 6). V kolikor primerjamo te rezultate z rezultati pogostosti delecij pri hrvaških otrocih, opazimo podobnost. Ugotovili smo namreč, da se v populaciji hrvaških otrok delecije v genu *GSTM1* v primerjavi z delecijo v genu *GSTT1* tako kot pri populaciji slovenskih otrok 2,4-krat pogosteje pojavljajo. Pogostost prisotnih delecij v obeh genih pa je ravno tako nizka (8,5%). Poleg tega smo ugotovili, da je v populaciji hrvaških otrok najpogosteje prisotna kombinacija delecije v genu *GSTM1* in odsotnost delecije v genu *GSTT1* (37,0%), kar je enako populaciji slovenskih otrok (38,0%).

4.3.7. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih

Podatki koncentracij Hg^{2+} in MeHg^+ v krvi mater in urinu otrok so pri slovenskih vzorcih manjkali, zato smo preučevali le povezavo delecije v genu *GSTT1* s koncentracijami Hg^{2+}

in MeHg^+ v popkovnični krvi ter z nevrotoksičnostjo otrok. Statistične analize smo se lotili tako, da smo najprej s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa preverili normalnost porazdelitve. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

Postavili smo dve hipotezi in nato določili statistično značilne povezave/vplive. Hipotezi sta ničelna in alternativna.

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih **je prisotna**.

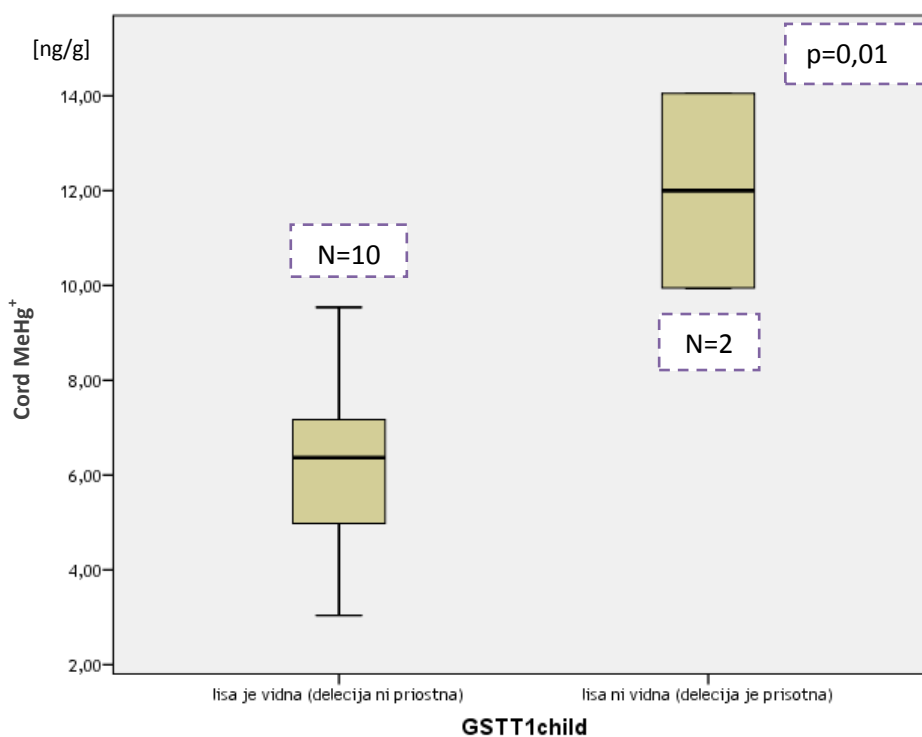
S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

Preglednica XVIII: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za gen *GSTT1*.

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
cord MeHg^+ (popkovnična kri)	ANOVA	0,01	12	H_a
ln cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,23	398	H_0
COG	Kruskal-Wallis test	0,01	242	H_a
LANG	ANOVA	0,09	242	H_a
MOT	Kruskal-Wallis test	0,01	242	H_a

Besedilo obarvano vijolično in krepko pomeni (mejno) statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

Pri tistih p-vrednostih, ki so manjše od 0,05, smo zavrgli H_0 in sprejeli H_a . Pri tej analizi smo torej ugotovili statistično značilno povezavo med delecijo v genu *GSTT1* in koncentracijo MeHg^+ v popkovnični krvi ($p=0,01$, Graf 7) ter nevrološki motnjami opisanimi z COG ($p=0,01$, Graf 8) in MOT ($p=0,01$, Graf 10). P-vrednosti, ki so bile med 0,05 in 0,1 smo obravnavali kot mejno statistično značilne. Ugotovili smo mejno statistično značilno povezavo med delecijo v genu *GSTT1* in nevrološki motnjami opisanimi z LANG ($p=0,09$, Graf 9). Pri tistih testih ANOVA, kjer smo dobili statistično značilne in mejno statistično značilne povezave/vplive, bi morali v nadaljevanju narediti še test ANCOVA. Pri tem bi upoštevali dejstvo, da na statistično značilen vpliv, ki jih dajejo testi ANOVA, lahko vplivajo tudi kovariate. Z ANCOVO namreč izključimo vpliv kovariat in preverimo, če še vedno obstaja statistično značilna povezava/vpliv. Testa ANCOVA zaradi velikega števila manjkajočih vzorcev nismo uspeli ustrezno izvesti.

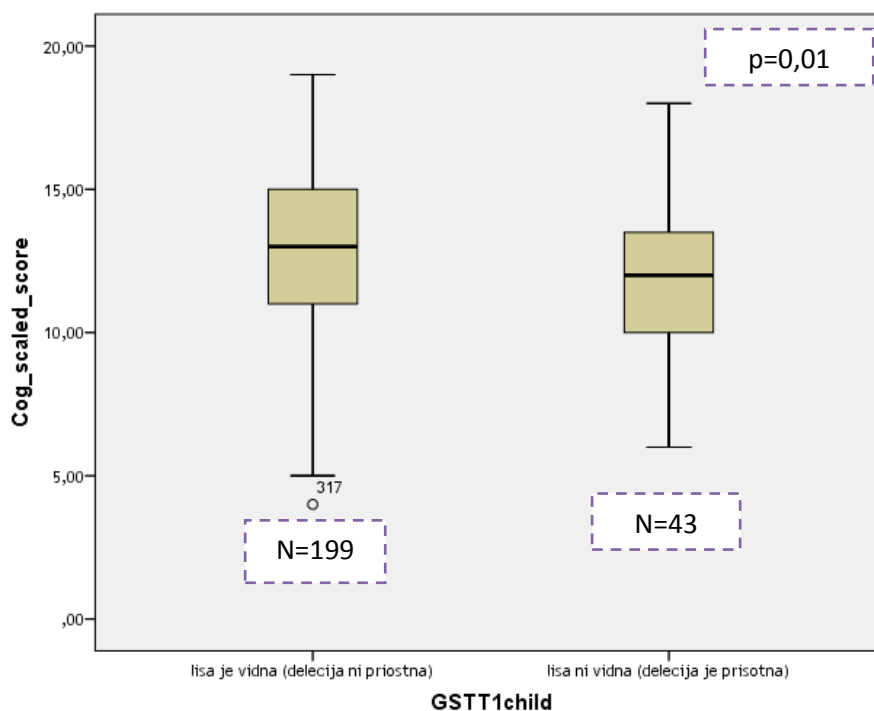


Graf 7: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg^+ v popkovnični krvi povezane z delecijo v genu *GSTT1*

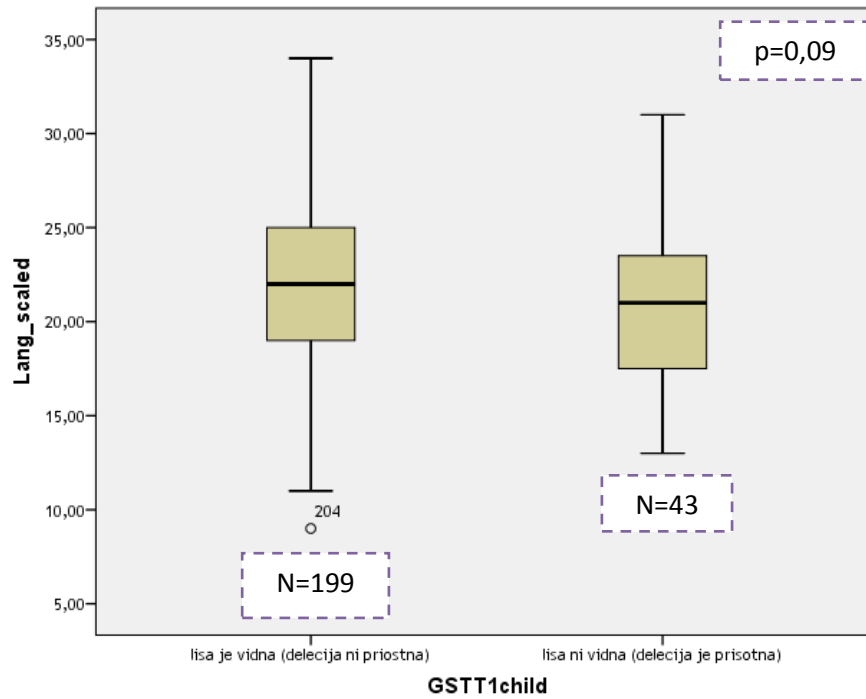
Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1* in povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi. Težava pri interpretaciji

teh rezultatov, ki se je moramo zavedati, je zelo majhno število vzorcev. Zaradi tega dejstva je moč statistične analize zelo majhna. Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate bi morali v analizo vključiti večje število vzorcev. Zaradi omenjene težave pri moči statistične analize sem v literaturi našla podatke, ki potrjujejo naše ugotovitve. V raziskavi so namreč dokazali statistično značilno povezavo med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1* in povišanimi koncentracijami MeHg⁺ v popkovnični krvi (44).

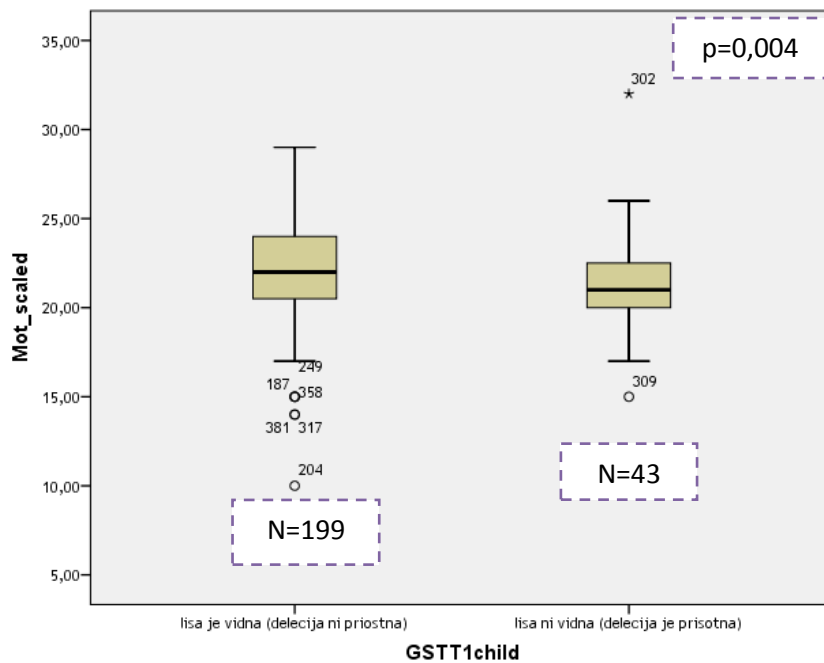
Od nevrologov smo dobili rezultate nevroloških testov, ki smo jih vključili v našo statistično analizo. Glede na p-vrednosti smo ugotovili statistično značilno povezavo med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1*, povišanimi koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok.



Graf 8: Povprečne vrednosti COG povezane z delecijo v genu *GSTT1*



Graf 9: Povprečne vrednosti LANG povezane z delecijo v genu *GSTT1*



Graf 10: Povprečne vrednosti MOT povezane z delecijo v genu *GSTT1*

Grafi 8, 9 in 10 prikazujejo povezavo med prisotnostjo delecije v genu *GSTT1* in vrednostmi nevroloških testov (COG, LANG in MOT). Pri tistih otrocih, ki so imeli

prisotno omenjeno delecijo, smo opazili nižje vrednosti nevroloških testov, kar pomeni, da imajo ti otroci več nevroloških motenj. Iz tega bi lahko sklepali, da višje koncentracije MeHg^+ v popkovnični krvi, ki so posledica prisotne delecije v genu *GSTT1* vplivajo na zmanjšane nevrološke sposobnosti otrok. Ta ugotovitev je v skladu z našo hipotezo, saj je aktivnost encima GSTT1 zaradi prisotne delecije v genu *GSTT1* odsotna ali zmanjšana. Posledica odsotne ali zmanjšane aktivnosti encima GSTT1 je manjša konjugacija in večje kopičenje MeHg^+ v tkivih, kar pa vpliva na nevrološke sposobnosti otrok.

4.3.8. Testiranje povezave med prisotnostjo delecije v genu *GSTMI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih

Podatki koncentracij Hg^{2+} in MeHg^+ v krvi mater in urinu otrok so pri slovenskih vzorcih manjkali, zato smo preučevali le povezavo delecije v genu *GSTMI* s koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter z nevrotoksičnostjo otrok. Najprej smo s Kolmogorov-Smirnovim testom preverili normalnost porazdelitve. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

Postavili smo dve hipotezi ter nato določili statistično značilne povezave/vplive.

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTMI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih **ni prisotna.**

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med delecijo v genu *GSTMI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih **je prisotna.**

S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

Preglednica XIX: Rezultati statističnih testov ANOVE pri otrocih za gen *GSTM1*

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In cord Hg ²⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,89	398	H ₀
cord MeHg ⁺ (popkovnična kri)	ANOVA	0,77	12	H ₀
COG	Kruskal-Wallis test	0,67	79	H ₀
LANG	ANOVA	0,78	242	H ₀
MOT	Kruskal-Wallis test	0,79	79	H ₀

Kratice COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratice LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratice MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H₀ pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

Iz Preglednice XIX je razvidno, da lahko pri vseh zgoraj testiranih parametrih zavržemo H_a in privzamemo, da velja H₀. Torej statistično značilne povezave med delecijo v genu *GSTM1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih nismo uspeli dokazati.

4.3.9. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* ter *GSTT1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih

Podatki koncentracij Hg²⁺ in MeHg⁺ v krvi mater in urinu otrok so pri slovenskih vzorcih manjkali, zato smo testirali le povezavo med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*, koncentracijami Hg²⁺ in MeHg⁺ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih. Statistične analize smo se lotili po ustaljenem postopku. Najprej smo s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa preverili normalnost porazdelitve. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

V nadaljevanju smo postavili dve hipotezi in nato določili statistično značilne povezave/vplive. Hipotezi sta:

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza (H_a): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*, koncentracijami Hg^{2+} in $MeHg^+$ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri slovenskih vzorcih **je prisotna**.

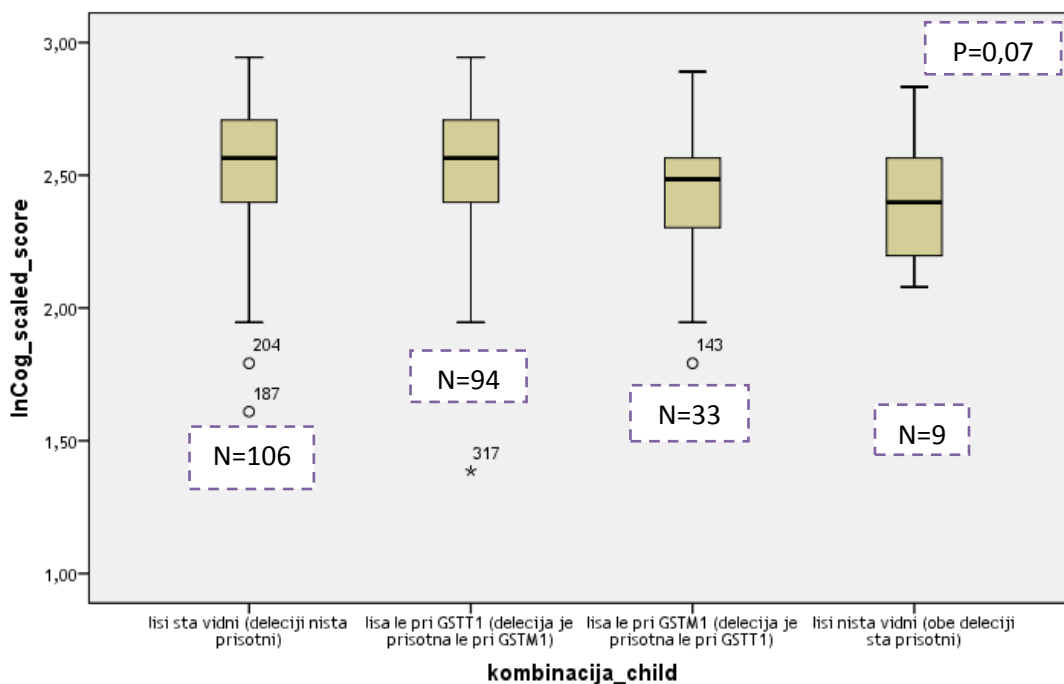
S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

Preglednica XX: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri otrocih za kombinacijo delecij v obeh genih

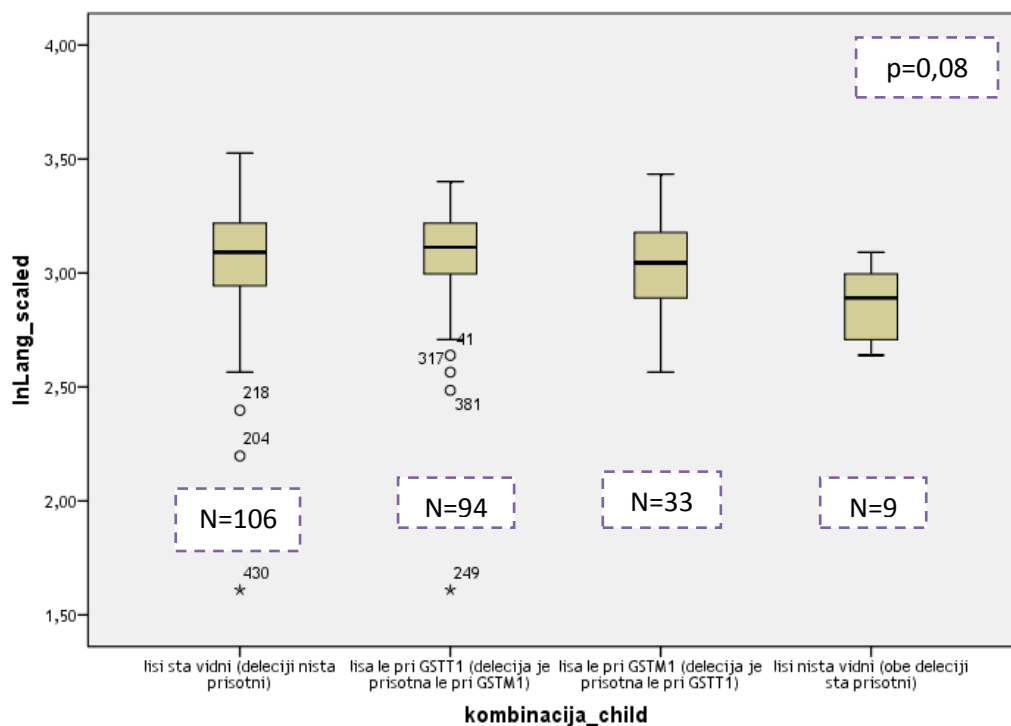
Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
cord $MeHg^+$ (popkovnična kri)	ANOVA	0,02	12	H_a
ln cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,75	297	H_0
COG	Kruskal-Wallis test	0,07	241	H_a
LANG	ANOVA	0,08	241	H_a
MOT	Kruskal-Wallis test	0,04	241	H_a

Besedilo obarvano vijolično in krepko pomeni (mejno) statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

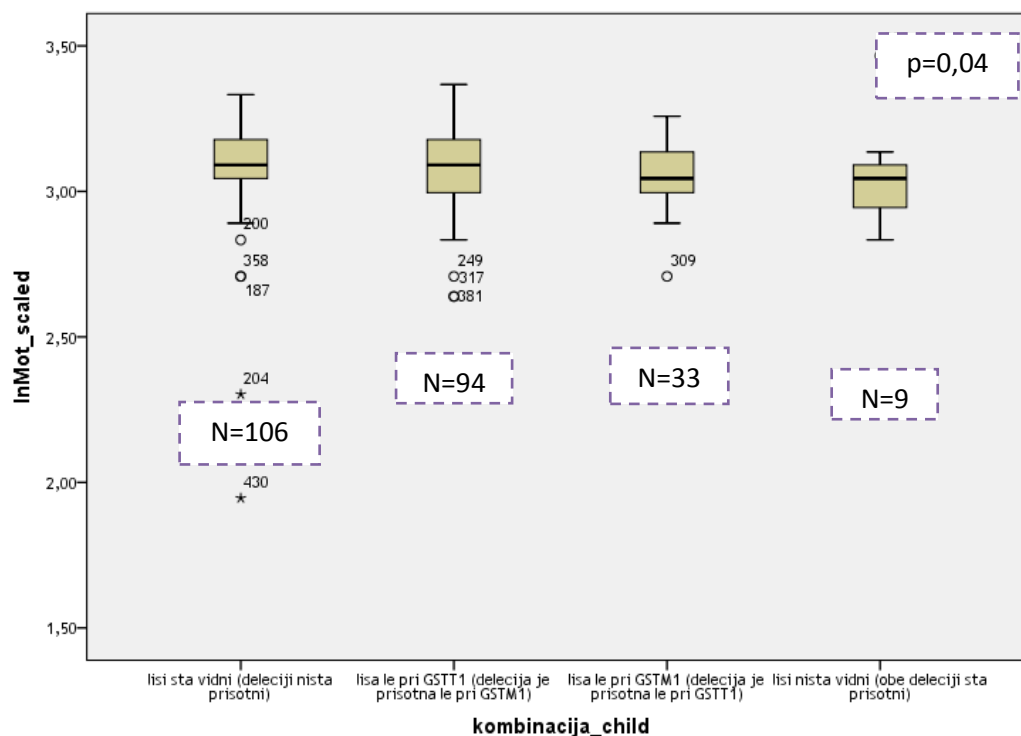
Pri interpretaciji rezultatov povezave možnih kombinacij delecij v obeh genih s koncentracijami $MeHg^+$ v popkovnični krvi imamo težavo s številom vzorcev. Zaradi zelo majhnega števila vzorcev imamo nizko statistično moč analize, zato rezultatov ne moremo ustrezno ovrednotiti in interpretirati. Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate, bi morali v analizo vključiti večje število vzorcev. Zaradi omenjene težave pri moči statistične analize sem v literaturi našla podatke, ki potrjujejo naše ugotovitve. V raziskavi so namreč dokazali statistično značilno povezavo med prisotnostjo kombinacij delecij v obeh genih in koncentracijami $MeHg^+$ v popkovnični krvi (44).



Graf 11: Povprečne vrednosti InCOG povezane z možnimi kombinacijami delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*



Graf 12: Povprečne vrednosti InLANG povezane z možnimi kombinacijami delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*



Graf 13: Povprečne vrednosti lnMOT povezane z možnimi kombinacijami delecij v genih *GSTM1* in *GSTT1*

V Grafih 11, 12 in 13 so zaradi lepšega prikaza uporabljene logaritmirane vrednosti MOT (lnMOT), LANG (lnLANG) in COG (lnCOG). Grafi prikazujejo povezavo možnih kombinacij delecij v obeh genih z vrednostmi nevroloških testov (COG, LANG in MOT). Kot lahko vidimo, so vse vrednosti najnižje pri tistih vzorcih, ki imajo prisotni obe deleciji, kar je v skladu z našo hipotezo. Očitno obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo delecij v obeh genih in nižjimi vrednostmi nevroloških testov (COG, LANG, MOT). Otroci, ki imajo nižje vrednosti teh testov, imajo več nevroloških motenj. Iz tega bi lahko sklepali, da višje koncentracije MeHg⁺ v popkovinični krvi ob prisotnosti delecij v obeh genih vplivajo na zmanjšane nevrološke sposobnosti otrok. Ta ugotovitev je v skladu z našo hipotezo, saj je aktivnost encima GSTM1 in GSTT1 zaradi prisotne delecije v genu *GSTM1* in *GSTT1* odsotna ali zmanjšana. Posledica odsotne ali zmanjšane aktivnosti obeh encimov pa je manjša konjugacija in večje kopičenje MeHg⁺ v tkivih, kar vpliva na nevrološke sposobnosti otrok.

4.3.10. Testiranje povezave med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* ter *GSTTI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo pri združeni populaciji hrvaških in slovenskih otrok

Poleg omenjenih testov smo ob koncu testirali še povezavo med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških in slovenskih otrocih. Zopet smo morali s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa preveriti normalnost porazdelitve. Glede na rezultate omenjenega testa smo nato uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA) ter neparametrične teste (Kruskal-Wallis test) - podrobneje opisano v poglavju 3.4.

V nadaljevanju smo postavili dve hipotezi in nato določili statistično značilne povezave/vplive. Hipotezi sta:

Ničelna hipoteza (H_0): Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških in slovenskih otrocih **ni prisotna**.

Alternativna hipoteza H_a : Statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI*, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v popkovnični krvi ter nevrotoksičnostjo otrok pri hrvaških in slovenskih otrocih **je prisotna**.

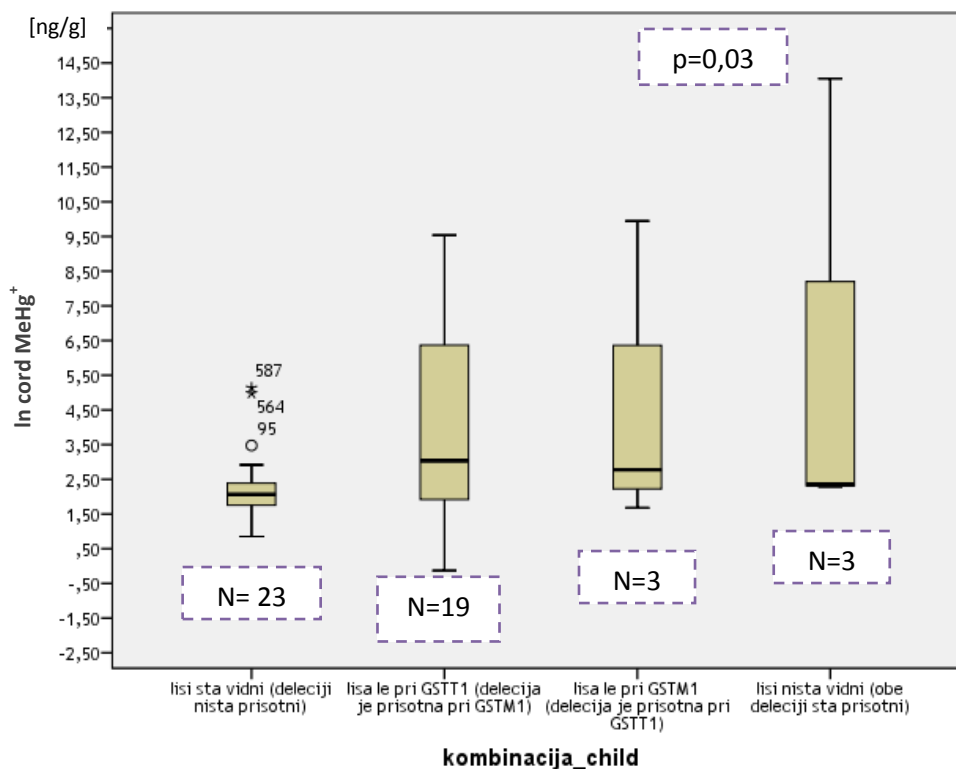
S pomočjo ANOVE in Kruskal-Wallisovega testa smo nato glede na p-vrednost določili veljavnost hipoteze.

Preglednica XXI: Rezultati statističnih testov ANOVE ter Kruskal-Wallisovega testa pri združeni populaciji otrok za kombinacijo delecij v obeh genih

Parameter	Statistični test	p-vrednost	Št. vzorcev (N)	Hipoteza
In cord Hg^{2+} (popkovnična kri)	ANOVA	0,95	619	H_0
In cord MeHg^+ (popkovnična kri)	ANOVA	0,03	58	H_a
COG	ANOVA	0,18	408	H_0
LANG	ANOVA	0,32	408	H_0
MOT	ANOVA	0,18	408	H_0

Besedilo obarvano vijolično in krepko pomeni statistično značilen rezultat. Kratica COG predstavlja kognitivne (miselne) sposobnosti, kratica LANG predstavlja retorične (govorne) sposobnosti in kratica MOT predstavlja motorične (gibalne) sposobnosti. H_0 pomeni ničelno hipotezo, H_a pa alternativno hipotezo.

Pri tistih parametrih, ki imajo p-vrednosti manjše od 0,05, smo zavrgli H_0 in sprejeli H_a . Pri tej analizi smo torej ugotovili statistično značilno povezavo med prisotnostjo kombinacij delecij v obeh genih in koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi ($p=0,03$, Graf 14).



Graf 14: Povprečne vrednosti koncentracij MeHg^+ v popkovnični krvi povezane z možnimi kombinacijami delecij v obeh genih

Graf 14 prikazuje povezavo možnih kombinacij delecij v obeh genih s koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi. Kot lahko vidimo, so koncentracije MeHg^+ v popkovnični krvi najvišje tam, kjer sta obe deleciji prisotni. Ta ugotovitev je v skladu z našo hipotezo, saj je aktivnost encima *GSTM1* in *GSTT1* zaradi prisotne delecije v genu *GSTM1* in *GSTT1* odsotna ali zmanjšana. Posledica odsotne ali zmanjšane aktivnosti obeh encimov je manjša konjugacija in večje kopičenje MeHg^+ v tkivih.

Pri interpretaciji teh rezultatov moramo biti zelo pazljivi, saj imamo spet težavo s statistično močjo. Zaradi majhnega števila rezultatov imamo nizko statistično moč analize.

Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate, bi morali v analizo vključiti večje število preiskovancev in si priskrbeti popolnejše rezultate. Zaradi omenjene težave pri moči statistične analize sem v literaturi našla podatke, ki potrjujejo naše ugotovitve. V raziskavi so namreč dokazali statistično značilno povezavo med prisotnostjo možnih kombinacij delecij v obeh genih s povišanimi koncentracijami MeHg⁺ v popkovnični krvi (44).

5. Sklep

V okviru mojega magistrskega dela smo poskušali dokazati povezavo med prisotnima delecijama v genih *GSTMI* in *GSTTI* (posamezno in v kombinaciji) ter povišanimi koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v krvi mater, popkovnični krvi in urinu otrok. V nadaljevanju smo želeli ugotoviti še vpliv omenjenih delecij na nevrotoksičnost pri otrocih, ki so bili prenatalno izpostavljeni tem toksičnim kovinam in je bila vsebnost le-teh v bioloških vzorcih povečana. Nevrotoksične posledice smo opredelili s pomočjo vrednosti nevroloških testov. Pri teh testih so se vrednotile kognitivne (miselne), retorične (govorne) in motorične (gibalne) sposobnosti otrok. Te vrednosti so nam posredovali nevrologi, ki so jih pridobili s pomočjo kliničnih pregledov in Baylejeve lestvice.

Raziskavo v sklopu magistrskega dela zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- ✚ Pri nosečnicah obstaja (mejno) statistično značilna povezava med prisotnostjo delecije v genu *GSTTI* in povišanimi koncentracijami MeHg^+ v krvi mater ter v popkovnični krvi.
- ✚ V skupini slovenskih otrok obstaja (mejno) statistično značilna povezava med prisotnostjo delecije v genu *GSTTI* in povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi ter znižanimi vrednostmi nevroloških testov (COG, LANG in MOT). Iz tega lahko sklepamo, da višje koncentracije MeHg^+ v popkovnični krvi, ki so posledica prisotne delecije v genu *GSTTI*, vplivajo na zmanjšane nevrološke sposobnosti otrok.
- ✚ Obstaja statistično značilna povezava med prisotnima delecijama v genih *GSTMI* in *GSTTI* in zmanjšanimi vrednostmi motoričnih nevroloških funkcij otrok v skupini mater in otrok.
- ✚ Obstaja (mejno) statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI*, povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi ter nižjimi vrednostmi nevroloških testov (MOT, LANG, COG) v skupini slovenskih otrok. Iz tega bi lahko sklepali, da višje koncentracije MeHg^+ v popkovnični krvi ob prisotnosti delecij v obeh genih vplivajo na zmanjšane nevrološke sposobnosti otrok.

- ✚ Obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo kombinacij delecij v genih *GSTMI* in *GSTTI* in povišanimi koncentracijami MeHg^+ v popkovnični krvi pri združeni populaciji slovenskih in hrvaških otrok.

Glede na zgornje ugotovitve ob koncu lahko povzamemo, da ima prisotna delecija v genu *GSTTI* v nasprotju s prisotno delecijo v genu *GSTMI* pomembno vlogo pri presnovi MeHg^+ in pri vplivu na nevrološke funkcije otrok. S statistično analizo smo dokazali tudi vpliv kombinacije delecij v obeh genih, vendar menim, da bi bilo v prihodnje to področje potrebno podrobneje raziskati.

Ob koncu bi omenila še težave pri interpretaciji, ki se jih moramo zavedati. Imeli smo namreč težavo z majhnim številom vzorcev. Zaradi tega dejstva je bila moč statistične analize zelo majhna. Za povečanje te statistične moči in bolj signifikantne rezultate, bi morali v prihodnje pridobiti popolnejše podatke in v raziskavo vključiti večje število preiskovancev.

Menim, da bi bilo v prihodnje smiselno povečati moč statistične analize in natančneje raziskati povezavo med vsemi tremi dejavniki skupaj, in sicer med genotipi mater in otrok, koncentracijami Hg^{2+} in MeHg^+ v različnih bioloških vzorcih in vrednostmi nevroloških testov (MOT, LANG, COG).

6. Literatura

1. Lawrence A. K, Amadeo J. P: Clinical Chemistry 3th Edition. Mosby, ZDA, 1996: 756.
2. Joško O: Izbrana poglavja iz klinične kemije. FFA, Ljubljana, 2008: 218-227.
3. Andreja K, Franc M, Dušan Š: Interna medicina, 3. izdaja. Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005:1506
4. John A.T: Principles of Biochemical Toxicology 4th Edition. Informa Healthcare, ZDA, 2009: 387-391, 106-110.
5. Klaassen C. D: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisen, 7th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2008: 948-950.
6. Windham B: Infertility, birth defects, and fetal developmental effects related to mercury from amalgam dental fillings & other toxins.
<http://www.flcv.com/fetaln.html> (dostopno 12.9.2013)
7. Llop S, Guxens M, Murcia M, Lertxundi A, Ramon R, Rian 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. American Journal of Epidemiology 2012; 175(5): 451-465.
8. Klaassen C. D: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisen, 7th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2008: 543.
9. Bertram G. K: Basic and Clinical pharmacology 10th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2007: 951.
10. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Elsevier, ZDA, 2007:675-729.
11. Thomas A. G, J. Douglas B: Principles of Biochemical Toxicology 3th Edition. Raven Press, ZDA, 1996: 196-198.
12. Sanfeliu C, Sebastià J, Cristòfol R, Rodríguez-Farré E: Neurotoxicity of Organomercurial Compounds. Neurotoxicity Research 2003; 5(4): 283-306.
13. Klaassen C. D: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisen, 7th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2008: 599.
14. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. Farmacevtski vestnik 2012; 63(3):153-157.

15. Osredkar J: Oksidativni stres - pregledni članek. Zdravniški vestnik 2012; 81: 393-406.
16. Klaassen C. D: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisen, 7th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2008: 1165-1166.
17. Camille Georges W: The practise of Medicinal Chemistry 3th Edition. Elsevier, ZDA, 2008: 669-671.
18. Ballatori N, Krance MS, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL: Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biological Chemistry 2009; 390(3): 191-214.
19. Graham L.P: An Introduction to Medicinal Chemistry 3th Edition. Oxford university press, ZDA, 2005: 144-146.
20. Carvalho CML, Chew E-H, Hashemy SI §1, Lu J, Holmgren A: Inhibition of the Human Thioredoxin System - A molecular mechanism of mercury toxicity. The Journal of Biological Chemistry 2007; 238(18): 11913-11923.
21. Kobal AB: Možni vpliv živega srebra na patogenezo avtizma. Zdravniški vestnik, 2009, 78: 37-44.
22. Goyer RA: Transplacental Transport of Lead. Environmental Health Perspectives 1990; 89: 101-105.
23. Klaassen C. D: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisen, 7th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2008: 149-150.
24. Ask K, Åkesson A, Berglund M, Vahter M: Inorganic Mercury and Methylmercury in Placentas of Swedish Women. Environmental Health Perspectives 2002; 110(5): 523-526.
25. Evseenko DA, Murthi P, Paxton JW, Reid G, Emerald BS, Mohankumar KM, Lobie PE, Brennecke SP, Kalionis B, Keelan JA: The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. The FASEB Journal 2007; 21: 3592-3605.
26. Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, Cascorbi I, Kroemer HK, Meyer zu Schwabedissen HE: Variable expression of mrp2 (abcc2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 2005; 33(7): 896-904.

27. Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F: P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reproductive Toxicology* 2006; 22(3): 400-410.
28. Klaassen C. D: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisen, 7th Edition. The McGraw-Hill Companies, ZDA, 2008: 285-293
29. William O. F., Thomas L.L., David A. W: Principle of Medicinal Chemistry 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, ZDA, 1995: 122-123.
30. Gareth T: Medicinal Chemistry an introduction. Jonh Wiley & Sons. Anglija, 2000: 358-359.
31. David A. W., Thomas L. L: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, ZDA, 2000: 208-209.
32. Muraki M: The expression mechanism of glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) as an aging marker.
<http://repository.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/dspace/bitstream/2261/52240/1/39-087121.pdf>
(dostopno: 1.12.2013)
33. Figueiredo Teixeira RL, Lopes MQP, Suffys PN, Santos AR: Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art, 2013: 114-116.
34. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09488> (dostopno: 25.9.2013)
35. Anna-Karinfg A, Agneta R, Erkki J, Gunnar T, Margareta W: Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene. *Lippincott Williams & Wilkins* 2002; 12 (8): 613-619.
36. Kumara V, Yadava CS, Dattaa KS, Singhc S, Ahmeda RS, Goelb S, Guptab S, Mustafaa M, Groverd RK, Dev Banerjeea B: Association of GSTM1 and GSTT1 polymorphism with lipid peroxidation in benign prostate hyperplasia and prostatecancer: A pilot study. *Disease Markers* 30, 2011: 163-169.
37. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTT2> (dostopno: 25.9.2013)
38. Jaclyn M. Goodrich. The Influence of Genetic Polymorphisms on Mercury Toxicokinetics: Evidence from Epidemiological and In Vitro Studies. Jaclyn M. Goodrich, ZDA, 2011: 12-13, 52.
39. Nazare Klautau-Guimarães M, D'Ascensão R, Caldart FA, Grisolia CK, R. de Souza J, Barbosa AC, Cordeiro CMT, Ferrari I: Analysis of genetic susceptibility to

- mercury contamination evaluated through molecular biomarkers in at-risk Amazon Amerindian populations. *Genetics and Molecular Biology* 2005; 28(4): 827-832.
40. Barcelos GRM, Grott D, Cristina de Marco K, Valentini J, Lengert AH, Soares de Oliveira AA, Garcia SC, Schläwicke Engström K, Mara de Syllos Cólus I, Broberg K, Barbosa Jr F, Úbida Leite Braga G: Polymorphisms in glutathione-related genes modify mercury concentrations and antioxidant status in subjects environmentally exposed to methylmercury. *Science of the Total Environment* 2013; 463-464: 319-325.
41. Wang Y, Goodrich JM, Gillespie B, Werner R, Basu N, Franzblau A: An Investigation of Modifying Effects of Metallothionein Single-Nucleotide Polymorphisms on the Association between Mercury Exposure and Biomarker Levels. *Environmental Health Perspectives* 2012; 120(5): 530-534.
42. Lawrence A. K., Amadeo J. P: *Clinical Chemistry* 3th Edition. Mosby, ZDA, 1996: 200 – 208.
43. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK: Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations. *Cancer Epidemiology Biomarkes & Prevention* 2011; 10: 1239-1248.
44. Lee B-E, Hong Y-C, Ha E-H: Interaction between *GSTM1/GSTT1* Polymorphism and Blood Mercury on Birth Weight. *Environmental Health Perspectives* 2010; 118(3): 437-443.

7. Priloge

7.1. Lastnosti preiskovane populacije

Preglednica XXII: Lastnosti nosečnic iz Hrvaške

Parameter	N	Srednja vrednost ± SD
<u>Starost (leta)</u>		
< 30	79	30,4 ± 4,7
30 - 35	80	
> 35	24	
<u>Kadilski status</u>		
nekadilka	109	/
kadilka	14	
bivša kadilka (1-5 let)	9	
bivša kadilka (6-10 let)	20	
bivša kadilka (>11 let)	22	
<u>BMI med nosečnostjo</u>		
< 18,5	10	23,2 ± 4,3
18,5 – 24,9	132	
> 24,9	41	
<u>količina zaužitih rib (g/teden)</u>		
< 150	29	303,3 ± 193,2
150 - 300	97	
301 - 450	46	
451 - 600	26	
> 600	10	
<u>Koncentracija Hg²⁺, MeHg⁺ v krvi, laseh, mleku, urinu in popkovnični krvi (ng/g)</u>		
Hg ²⁺ kri	211	2,8 ± 2,6
MeHg ⁺ kri	48	5,3 ± 3,6
Hg ²⁺ lasje	212	865,3 ± 1132,0
MeHg ⁺ lasje	44	2073,8 ± 1386,3

Hg ²⁺ mleko	117	0,27 ± 0,39
Hg ²⁺ urin	210	1,0 ± 2,5
Hg ²⁺ popkovnična kri	196	4,3 ± 4,5
MeHg ⁺ popkovnična kri	44	5,3 ± 3,6

Preglednica XXIII: Lastnosti hrvaških novorojenčkov

Parameter	N	Srednja vrednost ± SD
Koncentracija Hg ²⁺ , MeHg ⁺ v urinu (ng/g)	122	0,67 ± 3,64

Preglednica XXIV: Lastnosti preiskovane populacije nosečnic iz Slovenije

Parameter	N	Srednja vrednost ± SD
količina zaužitih rib (g/teden)	417	177,0 ± 149,2
<u>Koncentracija Hg²⁺, MeHg⁺ v laseh, popkovnični krvi in mleku (ng/g)</u>		
Hg ²⁺ lasje	404	325,8 ± 316,9
MeHg ⁺ lasje	10	1350,7 ± 431,1
Hg ²⁺ popkovnična kri	423	2,0 ± 1,7
MeHg ⁺ popkovnična kri	14	6,8 ± 2,9
Hg ²⁺ mleko	246	0,27 ± 0,30

7.2. Pogostost delecij v celotni preiskovani populaciji

Preglednica XXV: Pogostost delecij pri celotni preiskovani populaciji

Preiskovanec	Delecija	N	%
<i>GSTMI</i>			
Nosečnice (HR)	Prisotna	113	53,6
Nosečnice (HR)	Odsotna	98	46,4
Novorojenčki (HR)	Prisotna	76	46,1
Novorojenčki (HR)	Odsotna	89	53,9
Novorojenčki (SLO)	Prisotna	176	43,5
Novorojenčki (SLO)	Odsotna	229	56,5
<i>GSTTI</i>			

Nosečnice (HR)	Prisotna	51	24,2
Nosečnice (HR)	Odsotna	160	75,8
Novorojenčki (HR)	Prisotna	32	19,4
Novorojenčki (HR)	Odsotna	133	80,6
Novorojenčki (SLO)	Prisotna	72	17,8
Novorojenčki (SLO)	Odsotna	333	82,2
Kombinacija			
Nosečnice (HR)	<i>GSTM1/GSTT1</i> (odsotna)	77	36,5
Nosečnice (HR)	<i>GSTM1*0/GSTT1</i> (delno odsotna)	83	39,3
Nosečnice (HR)	<i>GSTM1/GSTT1*0</i> (delno odsotna)	21	10,0
Nosečnice (HR)	<i>GSTM1*0/GSTT1*0</i> (prisotna)	30	14,2
Novorojenčki (HR)	<i>GSTM1/GSTT1</i> (odsotna)	71	43,0
Novorojenčki (HR)	<i>GSTM1*0/GSTT1</i> (delno odsotna)	61	37,0
Novorojenčki (HR)	<i>GSTM1/GSTT1*0</i> (delno odsotna)	19	11,5
Novorojenčki (HR)	<i>GSTM1*0/GSTT1*0</i> (prisotna)	14	8,5
Novorojenčki (SLO)	<i>GSTM1/GSTT1</i> (odsotna)	179	44,2
Novorojenčki (SLO)	<i>GSTM1*0/GSTT1</i> (delno odsotna)	154	38,0
Novorojenčki (SLO)	<i>GSTM1/GSTT1*0</i> (delno odsotna)	52	12,8
Novorojenčki (SLO)	<i>GSTM1*0/GSTT1*0</i> (prisotna)	20	4,9

GSTM1/GSTT1 pomeni prisotnost obeh genov. *GSTM1*0/GSTT1* pomeni prisotnost gena *GSTT1* in odsotnost gena *GSTM1* (delecija). *GSTM1/GSTT1*0* pomeni prisotnost gena *GSTM1* in odsotnost gena *GSTT1* (delecija). *GSTM1*0/GSTT1*0* pa pomeni odsotnost obeh genov (delecija).

7.3. Rezultati genotipizacije

Preglednica XXVI: Rezultati genotipizacije hrvaških vzorcev

ID vzorca	<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1_otrok</i>	<i>GSTT1</i>	<i>GSTT1_otrok</i>	kombinacija	Kombinacija_otrok
100017	0	/	1	/	2	/

100021	1	/	1	/	3	/
100028	0	/	0	/	0	/
100044	0	/	0	/	0	/
100053	0	/	0	/	0	/
100057	1	/	0	/	1	/
100086	1	/	0	/	1	/
100102	1	/	0	/	1	/
100106	0	/	0	/	0	/
100107	0	/	1	/	2	/
100108	1	/	1	/	3	/
100111	1	/	0	/	1	/
100114	0	/	0	/	0	/
100115	0	/	0	/	0	/
100123	1	/	0	/	1	/
100129	1	/	1	/	3	/
100144	0	/	0	/	0	/
100155	0	/	0	/	0	/
100163	1	/	0	/	1	/
100164	0	/	0	/	0	/
100172	0	/	0	/	0	/
100174	0	/	0	/	0	/
100175	0	/	1	/	2	/
100177	1	/	0	/	1	/
100184	0	/	0	/	0	/
100186	1	/	0	/	1	/
100198	1	/	0	/	1	/
100203	0	/	0	/	0	/
100207	1	/	1	/	3	/
100208	0	/	0	/	0	/
100212	1	/	0	/	1	/

100214	1	/	0	/	1	/
100215	1	/	0	/	1	/
100216	0	/	0	/	0	/
100217	1	/	0	/	1	/
100218	0	/	0	/	0	/
100220	0	/	0	/	0	/
100221	0	/	1	/	2	/
100222	0	/	0	/	0	/
100223	1	/	0	/	1	/
100224	1	/	0	/	1	/
100225	1	/	0	/	1	/
100227	0	/	0	/	0	/
100229	1	/	0	/	1	/
100232	0	/	0	/	0	/
100234	1	/	0	/	1	/
100012	/	0	/	0	/	0
100015	1	0	0	1	1	2
100016	1	0	0	0	1	0
100022	1	1	0	0	1	1
100024	1	1	1	0	3	1
100026	1	0	0	0	1	0
100027	1	0	0	0	1	0
100030	1	1	0	0	1	1
100031	0	0	0	0	0	0
100032	1	0	0	0	1	0
100033	0	0	0	0	0	0
100038	0	1	0	0	0	1
100039	1	1	0	0	1	1
100042	0	0	1	1	2	2
100045	0	1	1	0	2	1

100046	1	0	0	0	1	0
100047	1	1	1	0	3	1
100050	1	1	1	1	3	3
100055	1	1	0	0	1	1
100058	0	0	0	0	0	0
100060	1	1	1	0	3	1
100063	1	0	0	0	1	0
100064	0	0	0	0	0	0
100066	0	0	0	1	0	2
100068	0	0	0	0	0	0
100069	1	1	1	0	3	1
100070	1	0	0	0	1	0
100072	1	1	0	0	1	1
100073	1	0	1	1	3	2
100074	1	1	0	0	1	1
100075	0	0	0	0	0	0
100077	1	1	1	1	3	3
100078	1	1	0	0	1	1
100082	0	0	0	0	0	0
100087	0	1	0	0	0	1
100090	0	0	0	0	0	0
100091	1	1	0	0	1	1
100093	0	0	1	0	2	0
100095	0	1	0	0	0	1
100096	1	0	0	0	1	0
100097	1	0	0	0	1	0
100098	0	0	0	0	0	0
100099	1	1	1	1	3	3
100100	0	1	0	0	0	1
100101	1	1	1	0	3	1

100104	1	0	1	1	3	2
100109	0	1	0	0	0	1
100117	1	1	0	1	1	3
100120	1	0	1	0	3	0
100124	0	0	0	0	0	0
100125	0	0	0	1	0	2
100131	0	0	0	0	0	0
100132	1	1	0	0	1	1
100138	1	0	0	0	1	0
100141	0	0	0	0	0	0
100152	1	1	0	0	1	2
100153	0	1	0	0	0	1
100157	0	0	1	1	2	2
100159	1	1	0	1	1	3
100162	0	1	0	0	0	1
100165	0	0	0	1	0	2
100166	1	1	0	0	1	1
100167	1	1	0	0	1	1
100168	0	0	1	0	2	0
100170	0	0	0	0	0	0
100171	0	0	0	0	0	0
100173	1	0	0	0	1	0
100182	1	1	0	0	1	1
100191	1	1	0	0	1	1
100192	0	0	0	0	0	0
100193	0	0	1	0	2	0
100196	1	1	1	1	3	3
100199	0	0	0	0	0	0
100200	1	1	0	0	1	1
100202	0	0	0	0	0	0

100209	1	1	1	0	3	1
100211	1	1	0	0	1	1
100213	1	1	0	0	1	1
100226	1	1	0	1	1	3
100228	0	0	1	0	2	0
100085	1	1	0	0	1	1
100013	1	/	0	/	1	/
100020	0	0	0	0	0	0
100029	1	1	0	1	1	3
100035	0	0	1	1	2	2
100036	1	1	1	0	3	1
100041	0	0	1	0	2	0
100043	0	1	0	0	0	1
100051	1	1	1	0	3	1
100052	1	1	0	0	1	1
100054	0	1	0	0	0	1
100056	0	1	0	0	0	1
100062	0	0	0	0	0	0
100067	0	0	0	0	0	0
100071	1	0	0	0	1	0
100076	1	1	1	1	3	3
100079	1	1	0	0	1	1
100080	0	1	0	0	0	1
100083	1	1	0	0	1	1
100084	1	1	0	1	1	3
100092	0	0	0	0	0	0
100094	0	0	0	0	0	0
100103	1	0	1	1	3	2
100110	1	1	0	1	1	3
100116	1	1	0	0	1	1

100118	1	0	1	0	3	0
100119	0	0	1	0	2	0
100122	1	1	1	0	3	1
100126	0	0	0	0	0	0
100127	1	1	0	0	1	1
100128	1	0	0	0	1	0
100134	1	0	0	0	1	0
100135	0	0	0	1	0	2
100136	0	1	0	0	0	1
100148	0	1	1	0	2	1
100150	0	1	0	0	0	1
100154	1	1	0	0	1	1
100156	1	1	0	0	1	1
100161	1	1	0	0	1	1
100169	0	0	0	0	0	0
100183	1	1	0	0	1	1
100185	1	0	1	0	3	0
100187	1	1	0	0	1	1
100190	1	0	0	1	1	2
100194	1	1	0	0	1	1
100195	1	0	1	0	3	0
100201	1	0	0	0	1	0
100205	0	0	0	0	0	0
100210	1	1	1	0	3	1
100230	0	0	0	0	0	0
100231	0	0	0	0	0	0
100233	1	1	1	0	3	1
100040	1	0	0	0	1	0
100065	1	0	1	1	3	2
100081	0	0	0	0	0	0

100088	0	1	1	0	2	1
100089	0	0	1	1	2	2
100105	0	0	0	1	0	2
100113	0	0	1	0	2	0
100130	0	0	0	0	0	0
100142	1	1	0	0	1	1
100143	1	0	0	0	1	0
100146	1	0	0	0	1	0
100149	0	1	1	0	2	1
100151	1	1	1	1	3	3
100176	0	0	1	0	2	0
100178	1	0	0	0	1	0
100179	0	0	0	1	0	2
100181	0	0	0	0	0	0
100188	1	1	1	0	3	1
100206	0	0	0	0	0	0
100219	0	1	0	0	0	1
100018	0	0	0	0	0	0
100023	0	0	0	1	0	2
100037	1	0	0	0	1	0
100140	1	0	0	0	1	0
100197	1	1	0	0	1	1
100121	0	0	0	0	0	0
100133	0	1	0	0	0	1
100137	0	0	0	0	0	0
100139	1	0	0	0	1	0
100145	0	0	0	0	0	0
100147	0	0	1	1	2	2
100158	1	1	0	1	1	3
100160	1	0	0	0	1	0

100025	1	1	0	1	1	3
---------------	---	---	---	---	---	---

Stolpec *GSTMI* in *GSTTI*: 0 pomeni delecija ni prisotna, 1 pomeni delecija je prisotna. Stolpec kombinacija: 0 pomeni delecija ni prisotna, 1 pomeni delecija je prisotna pri *GSTMI* in odsotna pri *GSTTI*, 2 pomeni delecija je prisotna pri *GSTTI* in odsotna pri *GSTMI*, 3 pomeni deleciji *GSTMI* in *GSTTI* sta prisotni. Znak / pomeni odsotnost vzorca.

Preglednica XXVII: Rezultati genotipizacije slovenskih vzorcev

ID vzorca	<i>GSTMI</i>_otrok	<i>GSTTI</i>_otrok	kombinacija_otrok
400290	0	1	2
400070	0	1	2
400074	1	0	1
400085	1	0	1
400090	1	0	1
400099	1	0	1
400103	0	1	2
400106	1	0	1
400107	0	0	0
400110	0	0	0
400111	0	0	0
400115	1	0	1
400116	1	1	3
400121	1	0	1
400123	0	1	2
400130	0	1	2
400133	0	0	0
400136	1	0	1
400137	1	0	1
400138	0	0	0
400141	1	0	1
400144	1	1	3
400149	1	0	1
400150	1	0	1

400156	1	0	1
400157	1	0	1
400166	1	0	1
400167	0	1	2
400171	0	0	0
400172	1	0	1
400175	1	0	1
400180	1	1	3
400181	/	/	/
400182	0	0	0
400187	1	0	1
400190	0	0	0
400192	0	1	2
400193	1	0	1
400198	0	0	0
400200	0	0	0
400201	1	0	1
400207	0	0	0
400208	0	0	0
400209	1	0	1
400210	1	0	1
400211	1	0	1
400212	0	0	0
400213	1	0	1
400215	1	0	1
400221	0	1	2
400228	0	0	0
400232	0	1	2
400235	0	0	0
400239	1	0	1

400241	0	0	0
400242	1	1	3
400250	0	0	0
400251	/	/	/
400254	0	1	2
400260	0	0	0
400261	0	0	0
400262	/	/	/
400270	1	0	1
400271	1	1	3
400274	1	0	1
400280	/	/	/
400281	0	0	0
400286	0	1	2
400287	0	1	2
400289	0	0	0
400292	0	1	2
400297	0	0	0
400298	/	/	/
400299	0	1	2
400300	0	1	2
400306	0	1	2
400307	0	1	2
400310	1	1	3
400311	0	0	0
400312	1	0	1
400315	1	0	1
400317	1	0	1
400329	0	0	0
400333	1	0	1

400336	0	0	0
400338	0	0	0
400339	0	0	0
400395	0	0	0
400399	0	0	0
400400	0	0	0
400402	1	0	1
400404	0	0	0
400405	1	0	1
400406	1	1	3
400408	0	0	0
400409	0	0	0
400412	/	/	/
400413	0	0	0
400415	0	0	0
400416	/	/	/
400417	/	/	/
400419	/	/	/
400420	/	/	/
400421	1	0	1
400422	/	/	/
400424	/	/	/
400425	/	/	/
400427	/	/	/
400429	0	0	0
400430	/	/	/
400431	1	0	1
400434	0	1	2
400435	1	0	1
400437	0	1	2

400439	1	0	1
400442	0	0	0
400445	/	/	/
400447	0	0	0
400448	0	0	0
400449	0	0	0
400450	0	0	0
400454	1	0	1
400456	1	0	1
400459	0	0	0
400460	0	0	0
400461	1	0	1
400467	0	1	2
400470	1	0	1
400477	1	0	1
400478	0	0	0
400479	1	0	1
400482	0	0	0
400483	0	0	0
400484	0	1	2
400487	0	0	0
400489	1	0	1
400490	1	0	1
400491	0	1	2
400492	1	0	1
400493	1	0	1
400494	0	0	0
400496	0	0	0
400497	0	1	2
400500	0	0	0

400501	1	0	1
400504	1	0	1
400507	1	0	1
400515	0	0	0
400518	1	0	1
400526	0	0	0
400532	0	0	0
400547	0	0	0
400550	1	0	1
400556	1	0	1
400557	0	0	0
400559	0	0	0
400560	1	0	1
400561	0	0	0
400565	1	0	1
400567	1	0	1
400568	1	0	1
400571	1	0	1
400572	0	0	0
400573	0	0	0
400580	0	1	2
400582	1	1	3
400583	0	0	0
400586	1	0	1
400592	0	0	0
400598	1	0	1
400599	0	0	0
400604	0	0	0
400605	0	0	0
400606	1	0	1

400607	0	0	0
400609	1	0	1
400611	0	0	0
400616	0	0	0
400617	1	1	3
400622	1	0	1
400623	0	0	0
400625	0	1	2
400628	0	0	0
400630	0	0	0
400634	0	0	0
400635	0	0	0
400637	0	0	0
400638	1	0	1
400639	0	0	0
400644	1	0	1
400645	0	0	0
400650	0	0	0
400651	0	0	0
400654	0	0	0
400655	0	0	0
400230	0	0	0
400472	0	0	0
400488	1	0	1
400076	0	0	0
400078	0	0	0
400089	0	0	0
400091	0	1	2
400093	0	0	0
400097	0	0	0

400098	0	1	2
400100	1	0	1
400105	0	0	0
400109	0	0	0
400112	0	0	0
400113	0	0	0
400117	1	0	1
400124	1	0	1
400132	1	0	1
400135	0	1	2
400140	1	0	1
400145	0	0	0
400146	1	0	1
400147	0	0	0
400148	0	0	0
400159	0	0	0
400160	0	0	0
400162	0	0	0
400165	0	0	0
400168	1	0	1
400177	1	0	1
400186	0	0	0
400194	1	0	1
400196	1	0	1
400222	0	0	0
400226	1	0	1
400231	1	0	1
400238	1	0	1
400267	1	0	1
400269	/	/	/

400273	0	0	0
400275	/	/	/
400277	0	0	0
400283	0	1	2
400285	1	0	1
400294	1	0	1
400295	0	1	2
400296	0	0	0
400301	0	0	0
400303	/	/	/
400304	0	0	0
400305	1	0	1
400308	1	1	3
400313	0	0	0
400314	1	0	1
400318	1	0	2
400319	0	0	0
400320	1	0	1
400321	1	0	1
400322	0	1	2
400323	0	0	0
400324	0	0	0
400325	0	1	2
400327	0	0	0
400328	0	0	0
400330	0	0	0
400334	0	0	0
400335	0	1	2
400340	1	0	1
400391	0	0	0

400392	0	0	0
400397	0	0	0
400401	0	0	0
400403	0	0	0
400407	1	1	3
400410	0	0	0
400411	1	0	1
400414	/	/	/
400423	/	/	/
400433	/	/	/
400436	0	0	0
400440	0	0	0
400443	0	0	0
400446	0	0	0
400451	0	0	0
400452	0	0	0
400466	1	0	1
400468	0	1	2
400471	1	1	3
400474	0	0	0
400480	0	0	0
400499	1	0	1
400502	1	1	3
400503	0	0	0
400505	0	0	0
400506	0	1	2
400516	0	0	0
400521	1	0	1
400522	1	1	3
400524	1	0	1

400528	0	0	0
400529	0	0	0
400534	1	1	3
400548	0	0	0
400551	0	1	2
400552	1	0	1
400553	0	0	0
400555	1	1	3
400562	0	0	0
400563	1	0	1
400566	0	0	0
400570	1	0	1
400574	1	0	1
400575	1	0	1
400577	0	1	2
400579	1	0	1
400581	1	0	1
400584	1	0	1
400587	0	1	2
400589	1	1	3
400594	1	0	1
400596	1	0	1
400601	1	0	1
400603	0	0	0
400608	1	0	1
400613	0	0	0
400615	0	0	0
400618	0	1	2
400620	0	0	0
400624	0	0	0

400626	1	0	1
400627	0	0	0
400632	0	1	2
400633	1	0	1
400636	0	0	0
400640	1	1	0
400641	0	0	0
400642	1	0	1
400647	0	0	0
400648	1	0	1
400649	0	0	0
400653	0	0	0
400075	1	0	1
400077	1	0	1
400101	0	1	2
400114	0	0	0
400129	1	0	1
400143	0	0	0
400155	0	1	2
400158	1	0	1
400188	0	0	0
400191	0	1	2
400195	1	0	1
400199	0	1	2
400229	1	0	1
400233	1	0	1
400237	0	0	0
400248	0	0	0
400252	1	0	1
400255	0	0	0

400284	0	1	2
400316	1	0	1
400396	0	0	0
400438	0	0	0
400453	0	0	0
400455	1	0	1
400457	1	0	1
400458	0	0	0
400463	0	0	0
400473	1	0	1
400486	0	1	2
400495	1	0	1
400508	1	0	1
400514	1	1	3
400523	0	0	0
400530	1	0	1
400564	0	0	0
400569	0	0	0
400576	1	0	1
400578	0	1	2
400588	0	0	0
400590	1	0	1
400591	0	0	0
400593	1	0	1
400595	0	0	0
400597	1	0	1
400600	1	0	1
400610	0	0	0
400612	1	0	1
400619	1	0	1

400629	1	0	1
400631	0	0	0
400652	1	0	1
400073	1	1	3
400104	1	0	1
400108	1	0	1
400179	0	0	0
400189	1	0	1
400214	0	1	2
400263	1	1	3
400268	0	1	2
400276	1	0	1
400309	0	1	2
400326	1	0	1
400428	0	0	0
400432	1	0	1
400444	0	0	0
400475	0	0	0
400481	0	0	0
400513	1	0	1
400602	1	0	1
400614	/	/	/
400096	1	0	1
400122	1	0	1
400126	0	0	0
400131	0	0	0
400151	0	1	2
400161	1	0	1
400185	0	0	0
400206	1	0	1

400240	/	/	/
400253	1	0	1
400256	1	0	1
400259	0	0	0
400282	1	0	1
400293	1	0	1
400302	/	/	/
400441	1	0	1
400476	1	0	1
400554	0	0	0
400558	1	0	1
400585	0	0	0
400621	0	0	0
400646	1	0	1
400656	1	0	1
400517	0	0	0

Stolpec *GSTMI* in *GSTTI*: 0 pomeni delecija ni prisotna, 1 pomeni delecija je prisotna. Stolpec kombinacija: 0 pomeni delecija ni prisotna, 1 pomeni delecija je prisotna pri *GSTMI* in odsotna pri *GSTTI*, 2 pomeni delecija je prisotna pri *GSTTI* in odsotna pri *GSTMI*, 3 pomeni deleciji *GSTMI* in *GSTTI* sta prisotni. Znak / pomeni odsotnost vzorca.