

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA RAVNIKAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA RAVNIKAR

DIPLOMSKA NALOGA

**POVEZAVA POLIMORFIZMOV V GENIH *SOD1*, *SOD2* IN *CAT*
Z RAZVOJEM OTROKA V ODVISNOSTI OD PRENATALNE
IZPOSTAVLJENOSTI Hg^{2+} IN MeHg**

**ASSOCIATION OF *SOD1*, *SOD2* AND *CAT* GENETIC POLYMORPHISMS
WITH CHILD DEVELOPMENT DEPENDING ON PRENATAL
EXPOSURE TO Hg^{2+} AND MeHg**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Vzorci krvi, las, mleka in urina nosečnic ter popkovnična kri so bili odvzeti v Sloveniji (Porodnišnica Ljubljana, UKC Ljubljana) in na Hrvaškem (Klinički bolniški center, Klinika za ginekologijo in porodništvo, Reka, v sodelovanju z inštitutom OIKON, d.o.o.) kot del raziskave evropskega projekta PHIME (Public Health Impact of long-term, low-level Mixed Element Exposure in susceptible population strata), sofinanciranem v 6. Okvirnem programu. Meritve koncentracij živega srebra in metilživega srebra ter ostalih toksičnih kovin so bile izmerjene na Inštitutu Jožefa Štefana, Odsek za znanosti o okolju, pod vodstvom raziskovalne skupine prof. Milene Horvat.

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 strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela.

Posebna zahvala je namenjena Kitak Domnu in Ravnikar Žigu za pomoč pri izdelavi slikovnega gradiva.

Izjava

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

Ljubljana, 2014

Mateja Ravnikar

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm. (izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.)

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 RAZVOJ OTROKA	1
1.1.1 Embriologija živčevja	1
1.1.2 Dejavniki, ki vplivajo na razvoj otroka	2
1.1.3 Časovni potek razvoja do starosti 18 mesecev	4
1.2 ZNAČILNOSTI ŽIVEGA SREBRA	6
1.2.1 Kroženje živega srebra v okolju	6
1.2.2 Toksikokinetika in toksikodinamika različnih kemijskih oblik Hg	7
1.2.3 Toksičnost živega srebra	8
1.2.4 Mehanizem prehoda MeHg in Hg ²⁺ preko hematoencefalne bariere in posteljice.....	9
1.2.5 Mehanizmi citotoksičnosti MeHg	9
1.2.6 Obdobje nosečnosti in prenatalna izpostavljenost živemu srebru.....	11
1.3 ANTIOKSIDANTNI OBRAMBNI MEHANIZMI PRI IZPOSTAVLJENOSTI ŽIVEMU SREBRU.....	11
1.3.1 Superoksidna dismutaza	12
1.3.2 Katalaza.....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Preiskovana populacija.....	17
3.2 Določanje celokupne koncentracije Hg in koncentracije MeHg.....	17
3.3 Izolacija DNK	18
3.4 Genotipizacija z uporabo TaqMan sond.....	18
3.5 Priprava vzorcev za PCR reakcijo v realnem času.....	19
3.5.1 Aparature in pribor uporabljeni pri eksperimentalnem delu	19
3.5.2 Reagenti.....	19
3.5.3 Priprava vzorcev	19
3.5.4 Potek PCR reakcije v realnem času.....	21

3.6	Bayley-III lestvice zgodnjega razvoja.....	22
3.7	Statistične metode	23
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	Genotipizacija in interpretacija rezultatov	26
4.2	Genotipske frekvence polimorfizmov v skupinah preiskovancev	30
4.3	Statistična analiza.....	33
4.3.1	Ugotavljanje povezanosti genetskih polimorfizmov z nevrološkim razvojem otroka	33
4.3.2	Vključitev sočasnih spremenljivk pri ugotavljanju povezanosti genetskih polimorfizmov z nevrološkim razvojem otroka	40
4.3.3	Ugotavljanje povezanosti kombinacije genotipov z nevrološkim razvojem otroka	47
4.3.4	Ugotavljanje povezanosti genetskih polimorfizmov pri hrvaških materah z nevrološkim razvojem hrvaških otrok.....	48
4.3.5	Ugotavljanje povezanosti celokupne koncentracije Hg oz. koncentracije MeHg z nevrološkim razvojem otroka	48
5	SKLEPI	54
6	VIRI.....	56
7	PRILOGE.....	60

OPOMBA AVTORJA

Pri polimorfizmu rs4880 (47T>C) v genu *SOD2* smo razlikovali med aleloma A in G, in ne med T in C, ki sta na komplementarni verigi. Zapis smo priredili v 47A>G.

POVZETEK

POVEZAVA POLIMORFIZMOV V GENIH *SOD1*, *SOD2* IN *CAT* Z RAZVOJEM OTROKA V ODVISNOSTI OD PRENATALNE IZPOSTAVLJENOSTI Hg^{2+} IN MeHg

Povišana koncentracija živega srebra (Hg) v organizmu vodi v povečano nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Motnje oksidativnega ravnotežja v nosečnosti lahko vodijo v nastanek motenj v razvoju zarodka in kasneje otroka. Škoda, povzročena s Hg, je odvisna od znotrajcelične koncentracije antioksidantov. Superoksidna dismutaza je prvi encim antioksidativne obrambe v organizmu. Njegova funkcija je odstranjevanje superoksidnega radikala. Funkcija katalaze je odstranjevanje vodikovega peroksida.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti povezanost enonukleotidnih polimorfizmov (SNP) v genih *SOD1*, *SOD2* in *CAT* z nevrološkim razvojem otroka. Prav tako smo želeli oceniti potencialni vpliv celokupne koncentracije Hg in koncentracije MeHg, izmerjene v različnih bioloških vzorcih, na razvoj otroka.

V analizo smo vključili 212 vzorcev hrvaških mater in 608 vzorcev novorojenčkov (178 hrvaških in 430 slovenskih otrok). Laboratorijsko delo je po izolaciji DNK iz popkovnega tkiva novorojenčkov in materine venske krvi obsegalo pomnoževanje tarčnih odsekov DNK in sočasno genotipizacijo z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času z uporabo alelnih specifičnih sond. Kognitivna, jezikovna in motorična funkcija otrok je bila ocenjena s pomočjo Bayley-III lestvic zgodnjega razvoja pri starosti 18 mesecev. Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s statističnim programom SPSS, verzija 21.0.

Ugotovili smo, da imajo slovenski otroci z genotipom GG polimorfizma rs4998557 v genu *SOD1* statistično značilno nižje vrednosti ocene fine motorike ($p = 0,040$) in motorične funkcije ($p = 0,041$) v primerjavi z genotipom AG. Na funkcijo fine motorike je vplivala tudi celokupna koncentracija Hg v popkovnični krvi. Slovenski otroci z genotipom AA polimorfizma rs4880 v genu *SOD2* so imeli statistično značilno nižje vrednosti ocene kognitivne funkcije ($p = 0,001$), funkcije razumevanja ($p = 0,031$), produkta kognitivne, jezikovne in motorične funkcije ($p = 0,013$) ter jezikovne funkcije otroka ($p = 0,074$; mejno signifikantna vrednost) v primerjavi z genotipom AG oz. genotipom AG in GG v primeru kognitivne funkcije. Na jezikovno funkcijo in produkt kognitivne, jezikovne in motorične funkcije je vplival tudi spol otroka ($p = 0,000001$ oz. $p = 0,001$). Po izključitvi vpliva spola otroka je postal efekt polimorfizma rs4880 (*SOD2*) na jezikovno funkcijo otroka statistično značilen ($p = 0,019$). Dečki so imeli statistično značilno nižje rezultate jezikovne funkcije in rezultate produkta kognitivne, jezikovne in motorične funkcije. Nismo ugotovili, da je polimorfizem rs1049982 v genu *CAT* značilno povezan z rezultati ocene trenutnega razvojnega stanja otroka.

Raziskavo bi nadalje nadgradili z večjim številom podatkov o koncentracijah MeHg v bioloških vzorcih mater in novorojenčkov ter z nadaljnjim spremljanjem razvoja otrok, vključenih v raziskavo. V naš statistični model bi bilo v nadaljnje smiselno vključiti tudi polimorfizme antioksidantov (glutation) in antioksidantnih encimov (glutation peroksidaza, tioredoksin) ki so vpleteni v zaščito celic preko vezave Hg na sulfhidrilne oz. selenohidrilne skupine.

ABSTRACT

ASSOCIATION OF *SOD1*, *SOD2* AND *CAT* GENETIC POLYMORPHISMS WITH CHILD DEVELOPMENT DEPENDING ON PRENATAL EXPOSURE TO Hg²⁺ AND MeHg

High mercury (Hg) levels in the organism lead to increased generation of reactive oxygen species (ROS). Alterations in placental oxidative stress may result in altered fetal development leading to long-term consequences. The extent of mercury-induced cell damage depends on the intracellular levels of antioxidants. Superoxide dismutase is the first line of antioxidative defence in the organism. These enzymes catalyze the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide is degraded by catalase. Within the scope of our research we evaluated the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *SOD1*, *SOD2* and *CAT* by assessing their association with child's neurodevelopment. We also looked at the potential influence of the total concentration of Hg and MeHg concentrations, measured in biological samples, on child's development.

We included 212 pregnant women from Croatia and 608 newborns (178 from Croatia and 430 newborns from Slovenia) in our analysis. After the DNA isolation from cord blood and mother's venous blood, we determined the genotypes of the analyzed polymorphisms using the method of real-time polymerase chain reaction and the allele specific probes. Child's cognitive, communication/language and motor development was determined using the Bayley scales of Infant Development III at the age of 18 months. Statistical analysis of our data was done using a selected statistical program SPSS, version 21.0.

Genotype GG of polymorphism rs4998557 (*SOD1*) was associated with lower scores of child's fine motor ($p = 0,040$) and motor development ($p = 0,041$) compared to genotype AG in Slovenian population. We also found significant effect of total Hg concentration in cord blood on child's fine motor skills. Genotype AA of polymorphism rs4880 (*SOD2*) was associated with lower scores of Slovenian child's cognitive development ($p = 0,001$), receptive communication ($p = 0,031$), product of cognitive, language and motor development scores ($p = 0,013$) and language development ($p = 0,074$; marginally significant association) compared to genotype AG or genotype AG and GG in the case of cognitive development. We also found significant effect of child's gender on language development ($p = 0,000001$) and product of cognitive, language and motor development scores ($p = 0,001$). After excluding the effect of gender the effect of polymorphism rs4880 (*SOD2*) on language development became statistically significant ($p = 0,019$). Boys had lower scores on language development and on cognitive, language and motor development scores product. No major role of polymorphism of rs1049982 (*CAT*) in child's scores on development was observed.

Moreover, we could upgrade our research with larger amount of data on MeHg concentration in biological samples of mothers and newborns and with further monitoring of child's development in the future. Including polymorphisms of antioxidants (glutathione) and antioxidant enzymes (glutathione peroxidase, thioredoxin), involved in the cell protection by binding Hg on sulfhydryl or selenohydryl groups, could significantly improve our statistical model.

SEZNAM OKRAJŠAV

-SH	sulfhidrilne skupine
-SeH	selenohidrilne skupine
5'-UTR	5'-nekodirajoča regija (angl. <i>5'-untranslated region</i>)
AAS	atomska absorpcijska spektroskopija
AIDS	akvirirani imunski deficitni sindrom
AK	aminokislina
Ala	alanin
ALS	amiotrofična lateralna skleroza
ANCOVA	analiza kovarianc
ANOVA	analiza varianc
BSID-III	Bayley-III lestvice zgodnjega razvoja
buHg	koncentracija živega srebra v urinu novorojenčkov (angl. <i>baby urine Hg</i>)
c	koncentracija (angl. <i>concentration</i>)
CAT	katalaza
COG	kognitivna funkcija (angl. <i>cognitive development</i>)
cordHg	koncentracija živega srebra v popkovnični krvi
cordMeHg	koncentracija metilživega srebra v popkovnični krvi
CV-AFS	atomska fluorescenčna spektrometrija hladnih par (angl. <i>cold vapor-atomic fluorescence spectrometry</i>)
Cys	cistein
CŽS	centralni živčni sistem
dH₂O	destilirana H ₂ O
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EC	funkcija izražanja (angl. <i>expressive communication</i>)
EPA	Agencija za varovanje okolja (angl. <i>Environmental Protection Agency</i>)
FM	funkcija fine motorike (angl. <i>fine motor development</i>)
GC-ECD	plinska kromatografija z detektorjem na zajetje elektronov (angl. <i>gas chromatography-electron capture detector</i>)
GIT	gastrointestinalni trakt
GM	funkcija grobe motorike (angl. <i>gross motor development</i>)
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
Hb	hemoglobin
HEB	hematoencefalna bariera
Hg_{cel}	celokupna koncentracija Hg
hHg	koncentracija živega srebra v lasih nosečnic (angl. <i>hair Hg</i>)
hMeHg	koncentracija metilživega srebra v lasih nosečnic (angl. <i>hair MeHg</i>)
HW	Hardy-Weinberg
K-W	Kruskal-Wallis

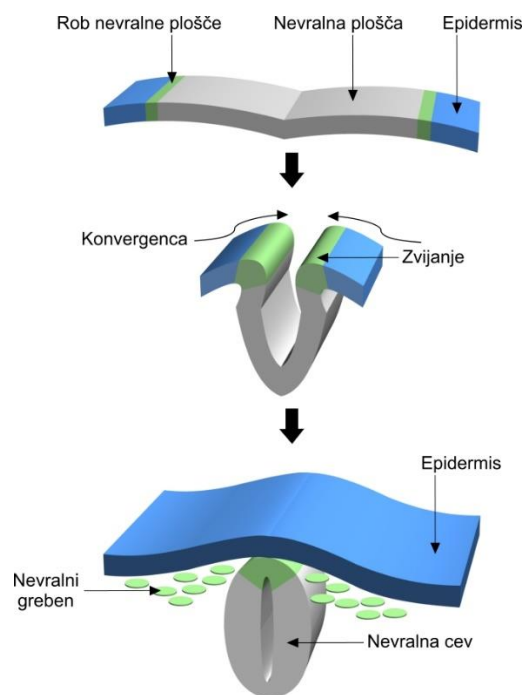
LANG	jezikovna funkcija (angl. <i>language development</i>)
LAT	L-aminokislinski prenašalec (angl. <i>L-aminoacid transporter</i>)
m	mesec
M-W	Mann-Whitney
mHg	koncentracija živega srebra v krvi nosečnic (angl. <i>maternal Hg</i>)
MeHg	metilživo srebro
milkHg	koncentracija živega srebra v mleku doječih mater
mMeHg	koncentracija metilživega srebra v krvi nosečnic (angl. <i>maternal MeHg</i>)
MOT	motorična funkcija (angl. <i>motor development</i>)
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
N	število
NMDA	N-metil-D-aspartat
OR	razmerje obetov (angl. <i>odds ratio</i>)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času oz. kvantitativni PCR (angl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
r_p	Pearsonov koeficient korelacije
r_s	Spearmanov koeficient korelacije
R²	determinacijski koeficient
RC	funkcija razumevanja (angl. <i>receptive communication</i>)
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
SD	standardna deviacija
SNP	enonukleotidni polimorfizem (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOD	superoksidna dismutaza
SV	srednja vrednost
Trx	tioredoksin
TrxR	tioredoksin reduktaza
Val	valin
η²	velikost učinka (angl. <i>eta squared oz. effect size</i>)

1 UVOD

1.1 RAZVOJ OTROKA

1.1.1 Embriologija živčevja

Iz ektoderma se v tretjem tednu zarodka razvije nevrnalna plošča, ki je osnova za nastanek živčnega sistema. Pri zvijanju nevrnalne plošče se izoblikujeta nevrnalna cev, ki se kasneje razvije v centralni živčni sistem (CŽS), in nevrnalni greben, ki se kasneje razvije v periferni živčni sistem (**slika 1**) (1, 2).



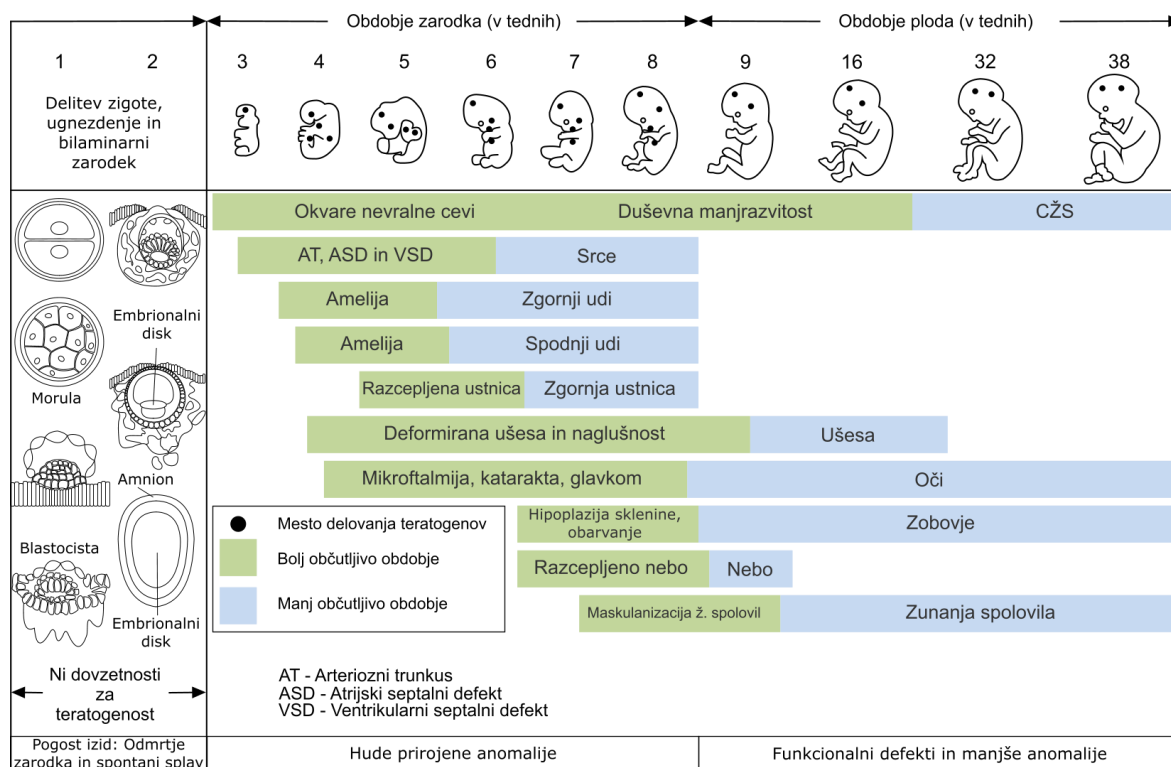
Slika 1: Izoblikovanje nevrnalne cevi in nevrnalnega grebena iz nevrnalne plošče

Iz celic nevrnalnega grebena se razvijejo spinalni in vegetativni gangliji, kromafine celice nadledvične žleze, Schwannove celice, satelitske celice ganglijev, melanociti, parafolikularne celice ščitnice, *glomus caroticus* in *glomus aorticus*, leptomeninge, vezivo v iztočnem traktu embrionalnega srca in odontoblasti. Nevralna cev se začne tvoriti v četrtem tednu razvoja zarodka. Iz zadebeljene stene nevrnalne cevi nastanejo možgani in hrbtni mozeg, iz nevrnalnega kanala pa nastane centralni kanal in možganski ventrikli. Iz kranialnega dela nevrnalne cevi se v četrtem tednu razvijejo trije možganski vezikli: prozencefalon (zasnova za možganski hemisferi in diencefalon-talamus), embrionalni

mezencefalon (zasnova za mezencefalon) in rombencefalon (zasnova za pons in male možgane ter podaljšan hrbtni mozeg). Iz mezenhima, ki obdaja nevrnalno cev, nastane primordialna membrana, iz te pa čvrsta in mehka možganska ovojnica. Cerebrospinalna tekočina se začne tvoriti v petem tednu zarodkovega razvoja. Pri plodu so živci sprva nemielinizirani, mielinizacija živcev se začne v dvajsetem tednu razvoja ploda in poteka še pri novorojencu. Površina možganskih hemisfer, ki je sprva gladka, postaja vse bolj razbrazdana (2).

1.1.2 Dejavniki, ki vplivajo na razvoj otroka

Zarodek (plod) je v različnih obdobjih različno občutljiv na dejavnike okolja, ki lahko povzročijo prirojene nepravilnosti. Poškodbe v prvih treh tednih razvoja zarodka so največkrat smrtne, zarodek odmre, in le redko povzročijo prirojene nepravilnosti. Obdobje največje občutljivosti zarodka na zunanje dejavnike je od 3. do 8. tedna razvoja, ko se razvije večina organov (3). Na **sliki 2** je shematično predstavljen razvoj zarodka oz. ploda.



Slika 2: Shematični prikaz razvoja zarodka/ploda, časovni prikaz razvoja različnih organov/organskih sistemov in kritične točke v prenatalnem obdobju razvoja (1)

Številni dejavniki vplivajo na razvoj nevrofizioloških funkcij otroka. Za vsak potencialno škodljiv dejavnik velja, da je obseg in narava učinka pogojena z značilnostjo gostitelja

(nosečnice) ter odmerkom in časom izpostavljenosti dejavniku. Dejavnike lahko razvrstimo v štiri kategorije (1, 4):

- genetski dejavniki,
- okoljski dejavniki,
- zdravstveni dejavniki,
- socialno-kulturni dejavniki.

Genetski dejavniki vključujejo kromosomske nepravilnosti, npr. trisomija 21. kromosomskega para (Downov sindrom). Specifične lokacije genov (kromosoma 6 in 15) so povezane s težavami pri branju. Dekleta s Turnerjevim sindromom (monosomija kromosoma X) lahko izkazujejo značilno okrnjenost vizualno-prostorskih sposobnosti. Otroci s sindromom fragilnega kromosoma X imajo lahko značilno slabše jezikovne sposobnosti. Določeni genetski polimorfizmi so lahko povezani s kasnejšim nastopom bolezni pod določenimi pogoji. V nadaljevanju diplomske naloge bodo natančneje predstavljeni genetski polimorfizmi antioksidantnih encimov SOD1, SOD2 in CAT. Okoljski dejavniki lahko vodijo do okužb v zgodnjem obdobju življenja, npr. AIDS, meningitis, septikemija so lahko vzrok za nastanek motenj v nevrofizioloških funkcijah otroka. Med okoljske dejavnike, ki imajo škodljiv učinek na razvoj otroka, uvrščamo tudi tobačni dim, svinec (Pb) in živo srebro (Hg). Vpliv Hg je podrobneje predstavljen v nadaljevanju diplomske naloge. Izpostavljenost teratogenom lahko poleg kongenitalne malformacije povzroči upočasnjeno rast in kognitivne ali vedenjske spremembe, ki se lahko izrazijo kasneje v življenju. Zdravstveni dejavniki lahko vključujejo hipoksično-ishemično encefalopatijo, nizko poporodno težo, zastoj rasti ploda v maternici, prenatalno izpostavljenost etanolu, tobaku in/ali prepovedanim drogam, poškodbe možganov zaradi intraventrikularne krvavitve. Prevodna (konduktivna) izguba sluha zaradi vnetja srednjega ušesa lahko vpliva na razvoj govora. Med socialno-kulturne dejavnike prištevamo prehrano, prenatalno nego, dostopnost zdravstvenega sistema, izobrazbo, inteligenčni kvocient (IQ), etničnost matere, spol, kulturo, podporne skupine, vzgojo (1, 4).

1.1.3 Časovni potek razvoja do starosti 18 mesecev

V preglednici I je predstavljen razvoj otroka od rojstva do 18. meseca starosti.

Preglednica I: Fizični/motorični, kognitivni, čustveni in komunikacijski razvoj otroka od 0 do 18 mesecev starosti (1)

STAROST (meseči) RAZVOJ	0-2	2-6	6-12	12-18
FIZIČNI/ MOTORIČNI	<ul style="list-style-type: none"> - obdobje najhitrejše postnatalne rasti (pribl. 30 g/dan) - nehoten smeh, - nekontrolirano zvijanje z odpiranjem in zapiranjem dlani - strmenje, obračanje glave in sesanje (ocena dojenčkove kognicije) - obračanje glave v smer materinega glasu (prepoznavanje, spomin) - 5-6 ur spanja/noč s prekinitvami (hranjenje) - učenje 	<ul style="list-style-type: none"> - med 3. in 4. mesecem se rast upočasni (pribl. 20 g/dan) - hoten smeh, povečan stik z očmi - izginejo refleksi, ki omejujejo hotene gibe (pregledovanje predmetov, manipuliranje z obema rokama, dvig in spust predmeta) - manjši cirkularni gibi; - nenormalni ali odsotni manjši gibi lahko predstavljajo tveganje za kasnejše nevrološke motnje - povečana kontrola upogibanja trupa - hranjenje po žlici - razvoj vidnega sistema (boljše globinsko zaznavanje) - 9-10 ur spanja/noč; 14-16 ur spanja/dan 	<ul style="list-style-type: none"> - rast se še upočasni - zmožnost sedenja brez opore (6-7 m) in obračanje med sedenjem (9-10 m) - istočasno manipuliranje z več predmeti - prijem s palcem in kazalcem (pincetni prijem) (8-9 m) - plazenje in poskusi vstajanja (pribl. 8 m), večina že shodi pri 1 letu; motorični razvoj korelira s povečano mielinizacijo in razvojem malih možganov - izrast prvega zoba (dozorevanje skeleta) 	<ul style="list-style-type: none"> - otroci imajo kratke noge in dolg trup - povečana lumbarna lordoza, povečan trebuh - povečan obseg glave; korelira z razvojem možganov in mielinizacijo - hoja s široko držo, upognjenimi kolena in rokami, rotiranje trupa pri korakanju - po nekaj mesecih: središče težnosti se pomakne nazaj, trup bolj stabilen, kolena so bolj stegnena, gibanje rok ob trupu za ravnotežje - ustavljanje, obračanje, sklanjanje

STAROST (meseči) RAZVOJ	0-2	2-6	6-12	12-18
KOGNITIVNI	<ul style="list-style-type: none"> - razločevanje vzorcev, barv in soglasnikov - prepoznavanje obrazne mimike - povezovanje abstraktnih lastnosti dražljajev, kot npr. okoliščine, jakost, časovni vzorec preko čutne zaznave - razlikovanje ritmičnih vzorcev v materinem in tujem jeziku (2 m) - vidni, otipljivi, vohalni, slušni dražljaji s strani starša/oskrbnika pospešujejo razvoj kognitivnih funkcij otroka - privajanje na znano, iskanje novih dražljajev 	<ul style="list-style-type: none"> - zanimanje za širšo okolico (4 m) - raziskovanje lastnega telesa - prva stopnja razvoja osebnosti - začetek razumevanja "vzroka in posledice" (hoten premik mišice povzroči predvidljive čutne in vidne zaznave) - povezovanje stalnega ponavljanja z določenimi zaznavami/občutki - poglobljena navezanost na mamo 	<ul style="list-style-type: none"> - učenje ravnanja s predmeti (pobiranje, pregledovanje, prenašanje iz ene v drugo roko, udarjanje ob drugo površino, spuščanje na tla, dajanje v usta); veselje, vztrajnost in energija pri otrokovi igri je dober pokazalec kognitivnega razvoja pri tej starosti - otroci, ki se počutijo varno, dosegajo boljše rezultate - zavedanje, da predmeti obstajajo, tudi če niso vidni (pribl. 9 m) 	<ul style="list-style-type: none"> - raziskovanje okolice se nadaljuje - izboljšana spretnost in gibljivost - novi načini ravnanja s predmeti (npr. zlaganje kock) - predviden namen uporabe igrač (npr. skodelica za pitje, glavnik za česanje) - oponašanje staršev ali starejših otrok
ČUSTVENI	<ul style="list-style-type: none"> - odvisnost od okolice (stalna navzočnost starša/oskrbnika, ki zadovolji dojenčkove osnovne potrebe) - navezanost na mamo - čustveni odziv na situacijo je odvisen od posameznikovega značaja in odziva staršev - pomemben urnik hranjenja 	<ul style="list-style-type: none"> - izrazita obrazna mimika; prikaz jeze, veselja, zanimanja, strahu, gnusa, presenečenja (začetek komunikacije) - različne igre (posnemanje obrazne mimike, petje, ročne igre) pospešijo socialni razvoj otroka 	<ul style="list-style-type: none"> - socialni in komunikacijski razvoj - strah pred neznanci - ločitev od staršev pogosto predstavlja težave - želja po avtonomiji 	<ul style="list-style-type: none"> - izrazita sprememba vedenja, ko otrok shodi - raziskovanje okolice in vračanje k staršem/oskrbnikom v varno zavetje; otrok, ki ne dobi spodbude in je pretirano nadzorovan občuti strah, dvom, jezo
KOMUNIKACIJSKI		<ul style="list-style-type: none"> - neverbalna komunikacija 	<ul style="list-style-type: none"> - neverbalna komunikacija, izražanje čustev, odzivanje na zvok in obrazno mimiko (7 m) - izgovorjava številnih zlogov, blebetanje (8-10 m) - socialne interakcije vplivajo na obogatitev in uporabo novih zvokov - prva izgovorjena beseda (bližnja oseba/predmet) 	<ul style="list-style-type: none"> - otrokovo razumevanje se izrazi bolj od izražanja - prve besede (pribl. 12 m), odzivanje na enostavne izraze - spontana in pravilna uporaba 4-6 besed (15 m) - uporaba nerazumljivega večzložnega žargona - večji del komunikacije ostaja neverbalen

Pomen okrajšav v preglednici: m: mesec

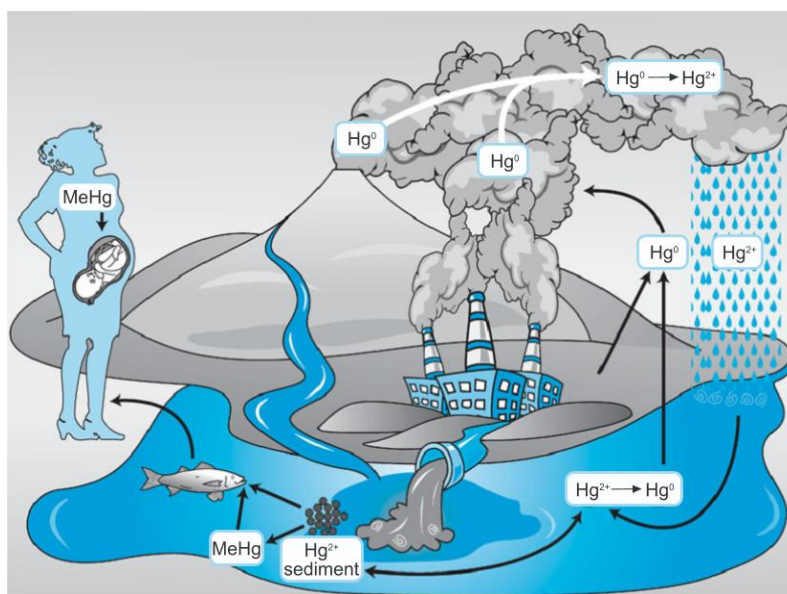
1.2 ZNAČILNOSTI ŽIVEGA SREBRA

1.2.1 Kroženje živega srebra v okolju

Živo srebro nastopa v naravnem okolju v treh kemijskih oblikah (5):

- elementarno živo srebro (Hg^0)
- anorganske Hg^{1+} in Hg^{2+} soli
- metilživo srebro (MeHg)

Hg preide v atmosfero iz naravnih in antropogenih virov v obliki hlapov elementarnega Hg (Hg^0). Sčasoma se Hg^0 oksidira v ionsko obliko Hg^{2+} , ki je topna v vodi, in se vrne na zemeljsko površje v obliki deževnice. V tej fazi se lahko Hg^{2+} reducira nazaj v Hg^0 in vrne v atmosfero ali pa se metilira s pomočjo mikroorganizmov prisotnih v vodnem sedimentu. Biometilacija vodi v nastanek metilživega srebra (MeHg). MeHg vstopi v prehransko verigo (6, 7). Nevrotoksičnost, kopičenje v organizmih ter biokoncentriranje v prehranskih verigah so razlogi, da velja MeHg za najnevarnejšo obliko Hg v okolju (8). Ljudje smo izpostavljeni MeHg preko uživanja rib in školjk (9). Kroženje Hg v okolju prikazuje **slika 3**.



Slika 3: Kroženje Hg v okolju (6)

1.2.2 Toksikokinetika in toksikodinamika različnih kemijskih oblik Hg

Vsaka od teh oblik ima specifične toksikokinetične in toksikodinamične lastnosti ter različno zmožnost prehoda preko posteljice (placente) in hematoencefalne bariere (HEB), ki so predstavljene v preglednici II.

Preglednica II: Značilnosti različnih kemijskih oblik živega srebra (5, 6, 9-13)

KEMIJSKA OBLIKA Hg	anorganske spojine		organske spojine
	elementarno živo srebro (Hg ⁰)	Hg ¹⁺ in Hg ²⁺ soli	metilživo srebro (MeHg)
VIRI IZPOSTAVLJENOSTI	- zobne zalivke (amalgam) - izgorevanje fosilnih goriv - poklicna izpostavljenost	- oksidacija Hg ⁰ ali demetilacija MeHg - zastrupitev s HgCl ₂ (reagent)	- ribe in školjke
ABSORPCIJA	- preko pljuč ≈ 80 % - preko prebavil (npr. tekoči Hg ⁰ , ki je v termometrih) ≈ 0,01 %	preko prebavil ≈ 7-15 %	- preko pljuč ≈ 80 % - preko prebavil ≈ 90-95 %
DISTRIBUCIJA	v vsa tkiva (zaradi dobre lipidotopnosti Hg ⁰)	- vezava na -SH skupine Hb in GSH - ledvice, jetra	- vezava na -SH skupine plazemskih proteinov in Hb (v krvi se kopiči v eritrocitih*) - v vsa tkiva (5 % se zadrži v krvi, 10 % celotnega MeHg se porazdeli v CZS)**
METABOLIZEM	oksidacija do Hg ²⁺ s pomočjo katalaze (v eritrocitih)	- vezava na -SH in -SeH skupine proteinov, AK, peptidov - majhen delež: redukcija do Hg ⁰ - v naravi poteka metilacija do MeHg s pomočjo mikroorganizmov	- vezava na -SH in -SeH skupine proteinov, AK, peptidov - demetilacija, ki poteka pretežno v jetrih, tudi v možganih
ELIMINACIJA	≈ 10 % z dihanjem - nastali Hg ²⁺ z urinom in blatom (razpolovni čas (t _{1/2}) varira glede na različne organe: nekaj dni – mesecev)	- prehod v proksimalni tubul - pretvorba konjugatov (GS-Hg-SG, Cys-S-Hg-S-Cys) do Hg ²⁺ , ki se nato izloči z urinom in blatom (t _{1/2} = 1-2 meseca) - majhen delež, ki se pretvori v Hg ⁰ se izloči z dihanjem	- izločanje z žolčem - enterohepatični obtok - pretvorba konjugatov (MeHg-SG, MeHg-S-Cys) do Hg ²⁺ , ki se nato izloči z urinom (≈ 10 %) in blatom (≈ 90 %) (t _{1/2} = 45-70 dni)
PREHOD SKOZI HEMATOENCEFALNO BARIERO (HEB)	+++	+	+++
PREHOD PREKO POSTELJICE	+++	+ (Hg ²⁺ se kopiči v posteljici in amnijski tekočini)	+++
TOKSIKODINAMIKA	nevrotoksičnost	nefrotoksičnost	nevrotoksičnost

Pomen okrajšav v preglednici: AK: aminokislina; CZS: centralni živčni sistem; Cys: cistein; GSH: glutation; Hb: hemoglobin; -SH: sulfhidrilne; -SeH: selenohidrilne; +++: enostavno, v veliki meri; +: v majhni meri

*razmerje eritrocit/plazma ≈ 20:1 (9)

**razmerje koncentracij: možgani/kri ≈ 7; lasje/kri ≈ 250; možgani zarodka/kri matere ≈ 5-7 (11)

1.2.3 Toksičnost živega srebra

V preglednici III so predstavljeni simptomi in znaki zastrupitve s Hg.

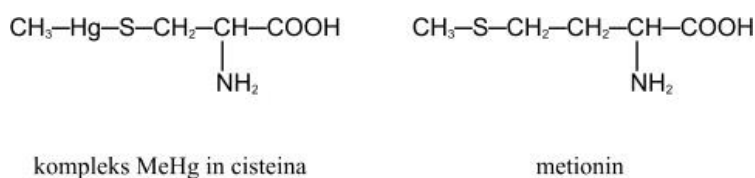
Preglednica III: Simptomi in znaki akutne in kronične zastrupitve ter vpliv različnih kemijskih oblik Hg na razvoj otroka (5)

KEMIJSKA OBLIKA ZASTRUPITEV	elementarno živo srebro (Hg^0)	Hg^{1+} in Hg^{2+} soli	metilživo srebro (MeHg)
AKUTNA	<p>Kritični organ: <u>pljuča</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - erozivni bronhitis in bronhiolitis z intersticijskim pnevmonitisom - respiratorna insuficienca <p>CŽS: tremor, povečana vzdražnost</p>	<p>Kritični organ/ organski sistem: <u>ledvice, GIT</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - huda bolečina v želodcu, bruhanje - abdominalna bolečina, hematohezija (lokalni korozivni učinek) - cirkulatorni kolaps, smrt - ledvična tubularna nekroza z anurijo in uremijo - lokalni vazospazem (aktivacija angiotenzinskega sistema) 	<p>Kritični sistem: <u>CŽS</u></p> <p>Prenatalna izpostavljenost:</p> <ul style="list-style-type: none"> - možganska paraliza, ataksija – motnje gibanja, mentalno poslabšanje - hipoplazija možganov, s simetrično atrofijo velikih in malih možganov - zmanjšano število nevronov in porušenje citoarhitektonike - psihomotorična zaostalost <p>Postnatalna izpostavljenost:</p> <ul style="list-style-type: none"> - parestezije v udih, jeziku, okoli ustnic - ataksija, zoženo vidno polje, poslabšanje sluha, ekstrapiramidni znaki - klonični krči - nevronska degeneracija v možganski skorji z gliozo - atrofija možganske skorje
KRONIČNA	<p>Kritični sistem: <u>CŽS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - astenični vegetativni sindrom (simptomi živčne oslabelosti, utrujenost, anoreksija, izguba telesne teže, motnje v GIT) - tremor, eretizem (spremembe vedenja in osebnostnega značaja, razdražljivost, izguba spomina, nespečnost, depresija; v hujših primerih tudi delirij in halucinacije) - vnetje dlesni, povečano slinjenje 	<p>Neobičajno (pogosto kombinacija Hg^0 in Hg^{2+})</p> <p>Kritični organ: <u>ledvice</u></p> <p>Drugi organski sistemi/organi: imunski sistem, mišično tkivo, ščitnica</p> <ul style="list-style-type: none"> - povečano slinjenje, vnetje dlesni, črne obrobe na zobeh (obarjanje HgS) 	
VPLIV NA RAZVOJ OTROKA	<ul style="list-style-type: none"> - Hg^0 se oksidira do Hg^{2+} - možgansko tkivo zarodka je najbolj občutljivo za Hg^{2+} ione! - splav, povečana incidenca neonatalne smrti in pojava razvojnih motenj (motnje pri migraciji živčnih celic, dolgoročne spremembe vedenja z zmanjšano zmožnostjo učenja in adaptacije) \approx učinki MeHg 		

Pomen okrajšav v preglednici: CŽS: centralni živčni sistem; GIT: gastrointestinalni trakt

1.2.4 Mehanizem prehoda MeHg in Hg²⁺ preko hematoencefalne bariere in posteljice

Mehanizem prehoda MeHg preko hematoencefalne bariere (HEB) in posteljice ni popolnoma pojasnjen. Najbolj verjetna razlaga je, da se MeHg veže na –SH skupine aminokislina cisteina (Cys), pri čemer nastane kompleks (MeHg-S-Cys), ki je strukturno podoben AK metioninu in lahko preko aminokislinskih prenašalcev (sistem L-aminokislinskih prenašalcev oz. LAT) prehaja HEB in posteljico (**slika 4**) (5, 6, 14). Podobno za Hg²⁺ domnevajo, da tiolni konjugati oponašajo strukturo AK, ki prehaja preko enega ali več aminokislinskih prenašalcev. Hg²⁺ prehaja HEB in posteljico le v majhni meri (5).

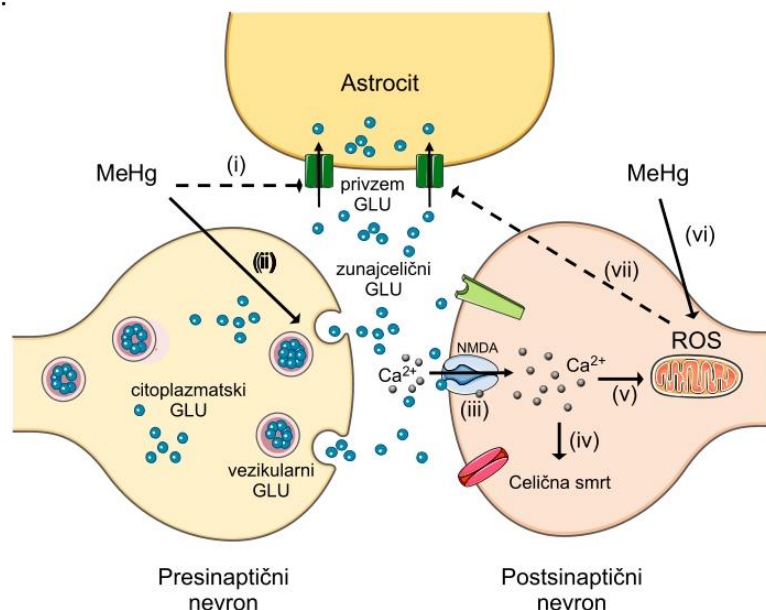


Slika 4: Kompleks MeHg in L-cisteina strukturno posnema aminokislino L-metionin

1.2.5 Mehanizmi citotoksičnosti MeHg

Glavna tarča MeHg so astrociti (15). Poznanih je več mehanizmov citotoksičnosti (9, 10, 14):

- a) zaviranje privzema glutamata v astrociti (**slika 5, (i)**) in sinaptične vezikle ter povečanje sproščanje glutamata iz živčnih celic (**slika 5, (ii)**). Povišanje koncentracije glutamata in s tem prekomerna stimulacija NMDA (N-metil-D-aspartat) ionotropnih receptorjev (**slika 5, (iii)**) vodi v povišanje znotrajcelične koncentracije Ca²⁺ ionov. Preobremenitev homeostaze za Ca²⁺ ione v celici aktivira procese, ki vodijo v smrt celice (**slika 5, (iv)**). Privzem Ca²⁺ ionov v mitohondrije je glavni vzrok za ekscitotoksično celično smrt, saj se preko povečanega privzema Ca²⁺ v mitohondrije sproži nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (**slika 5, (v)**), ki poškodujejo mitohondrijsko dihalno verigo. MeHg lahko tudi direktno spodbudi nastanek ROS (**slika 5, (vi)**). Povišana koncentracija ROS (predvsem H₂O₂) lahko neposredno zmanjša privzem glutamata v astrociti (**slika 5, (vii)**) in prispeva k ekscitotoksičnosti. (14, 16, 17).



Slika 5: MeHg poruši homeostazo glutamata (GLU) in Ca^{2+} ter povzroči nastanek ROS (14)

- b) indukcija oksidativnega stresa zaradi nastanka ROS (**slika 5, (vi)**) in/ali oslabiljenega obrambnega mehanizma. Prevelika količina ROS lahko povzroči lipidno peroksidacijo, poškodbe DNK, zavre aktivnost celičnih encimov in preko kaskadne aktivacije kinaz in kaspaz spodbudi celično smrt (9, 10, 18).
- c) vpliv na signalne poti v celici in na izražanje genov, ki so vključeni v celični metabolizem, proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo (19-22)
- d) vezava na sulfhidrilne (-SH) skupine in tvorba kompleksov s proteini, ki vsebujejo AK cistein ali metionin (glutation). Vezava na -SH skupine peptidov vodi v spremembe v strukturi peptidov in/ali inhibicije encimov. Ena izmed glavnih tarč MeHg so mikrotubuli (zaviranje celične delitve) (9, 10, 23).
- e) vezava na selenohidrilne (-SeH) skupine in tvorba kompleksov s proteini, ki vsebujejo AK selenocistein (glutation peroksidaza (GPx), tioredoksin reduktaza (TrxR)) (10, 14, 24)

Gre za med seboj povezane dogodke. MeHg pri visoki koncentraciji (5-10 μM) reagira nespecifično, pri čemer nastopi celična nekroza - pasivni proces. Nizke koncentracije MeHg (0,5-1 μM) povzročijo specifično škodo, ki sproži apoptotsko celično smrt – aktivni proces (9).

1.2.6 Obdobje nosečnosti in prenatalna izpostavljenost živemu srebru

Nosečnost je fiziološko stanje povišanega oksidativnega stresa zaradi velike metabolične aktivnosti v mitohondrijih posteljice. Posteljica ima ključno vlogo pri tvorbi ROS in uravnavanju oksidativnega ravnotežja v nosečnosti. 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 (25).

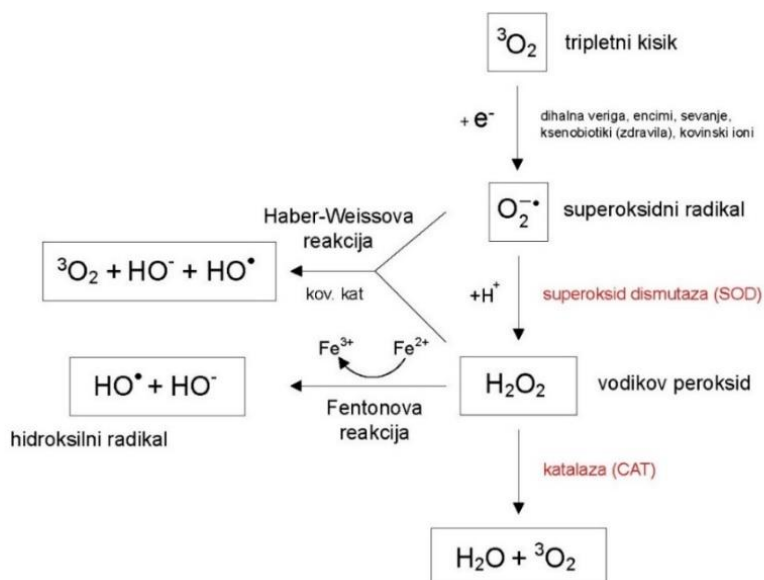
Poškodbe CZS se pri novorojenčku lahko pojavijo tudi, če se pri materi, ki je bila v nosečnosti izpostavljena Hg, niso razvili toksični znaki (26, 27). Pri celokupni telesni obremenitvi s Hg <0,5 mg/kg telesne teže (<200 µg/L v krvi; <50 mg/kg v laseh) obstaja zelo majhna verjetnost pojavnosti nevroloških znakov pri odraslih (5).

1.3 ANTIOKSIDANTNI OBRAMBNI MEHANIZMI PRI IZPOSTAVLJENOSTI ŽIVEMU SREBRU

Človeški organizem ima kompleksen antioksidativni obrambni sistem (preglednica IV), ki med drugim vključuje antioksidantne encime: SOD, CAT, GPx in druge. Individualne razlike v antioksidativni kapaciteti zaradi genetskega profila lahko potencialno vplivajo na posameznikovo dovzetnost za oksidativni stres (28). V okviru diplomske naloge bomo natančneje obravnavali tri antioksidantne encime, SOD1, SOD2 in CAT. Shema njihovega delovanja je predstavljena na **sliki 6**.

Preglednica IV: Razdelitev antioksidantov glede na izvor in kemijsko strukturo (29)

KEMIJSKA STRUKTURA IZVOR	NEENCIMSKI	ENCIMSKI
ENDOGENI	glutation (GSH)	superoksidna dismutaza (SOD)
	sečna kislina	katalaza (CAT)
	ubikinon Q ₁₀	glutation peroksidaza (GPx)
	bilirubin	glutation reduktaza (GR)
	melatonin	glutation-S-transferaza
	melanin	tiorredoksin (Trx)
	transferin	Trx reduktaza (TrxR)
	laktoferin	
EKSOGENI	vitamin E (tokoferol)	
	vitamin C (askorbinska kislina)	
	β-karoten	



Slika 6: Mesti delovanja encimov superoksid dismutaze (SOD) in katalaze (CAT) (30)

1.3.1 Superoksidna dismutaza

Je prvi encim antioksidativne obrambe v organizmu. Funkcija superoksidne dismutaze (SOD) je odstranjevanje superoksidnega radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (30). SOD katalizira reakcijo dismutacije, v kateri iz dveh molekul superoksida nastaneta molekula vodikovega peroksida in kisika (enačba 1) (31).



Poznanih je več oblik encima. Vse oblike SOD encima imajo podobno funkcijo. V aktivnem mestu lahko imajo Cu-Zn, Fe, Mn ali Ni (prokarionti) (30). Njihova aktivnost se pri človeku razlikuje od tkiva do tkiva in je največja v jetrih, ledvicah in vranici (32). Glavne 3 izoformne oblike encima SOD v sesalskih celicah so predstavljene v preglednici V.

Preglednica V: Osnovne značilnosti SOD izoencimov (18, 30, 31, 33)

ENCIM	Cu/Zn-SOD	Mn-SOD	EC-SOD
MESTO V CELICI	citoplazma, jedro, lizosomi, mitohondrijska membrana	matriks mitohondrija	izvencelična tekočina, plazemska membrana
MASA PROTEINA (kDa)	32	88	120
PROTEINSKA STRUKTURA	homodimer	homotetramer	homotetramerni glikoprotein
KOVINSKI ION V AKTIVNEM MESTU	Cu ²⁺ - katalitično aktiven Zn ²⁺ - vzdržuje stabilnost encima	Mn ²⁺ - katalitično aktiven	Cu ²⁺ - katalitično aktiven Zn ²⁺ - vzdržuje stabilnost encima
LOKACIJA (kromosom)	21	6	4
KODIRA GA GEN	<i>SOD1</i>	<i>SOD2</i>	<i>SOD3</i>
UTIŠANJE GENA	neletalno	letalno	neletalno

Med normalno nosečnostjo je aktivnost SOD v plazmi in eritrocitih višja kot pri nenosečih ženskah ter narašča s tedni nosečnosti (25). Vse tri oblike encima se izražajo v tkivu posteljice, tako da je narasla aktivnost encima SOD v materinem krvnem obtoku lahko posledica tega povečanega nastajanja (34).

1.3.1.1 Polimorfizmi v genu *SOD1*

V raziskavah so odkrili povezavo med polimorfizmi v genu *SOD1* in amiotrofično lateralno sklerozo (ALS). Natančen mehanizem, kako različne spremembe v genu *SOD1* vplivajo na razvoj nevrodegenerativnih bolezni, ni poznan (35). Pri miših brez zapisa za gen *SOD1* (angl. *knockout mice*) so poročali o izgubi mišične mase, zmanjšani plodnosti, makularni degeneraciji, hepatocelularnem karcinomu in krajši življenjski dobi (18).

- *Polimorfizem 73-1211G>A (rs4998557)*

Enonukleotidni polimorfizem (angl. *Single Nucleotide Polymorphism; SNP*) 73-1211G>A, ki ga bomo obravnavali tudi v tej diplomski nalogi, se nahaja v intronskem zaporedju 1 gena *SOD1*. Spremembo 73-1211G>A so preučevali v povezavi z rakom želodca, prostate in dojk. Povezavo so našli med 73-1211G>A polimorfizmom in rakom želodca. Prisotnost alela A predstavlja večje tveganje za pojav raka želodca pri azijski (Chinese Han) populaciji (OR = 3,01). Avtorji članka menijo, da bi sprememba v intronu lahko vplivala na pojavnost raka želodca preko reguliranja izražanja gena in alternativnega izrezovanja intronov. Z določitvijo izražanja gena *SOD1* in funkcijsko analizo bi bilo to predpostavko potrebno dodatno potrditi (36). V študiji, kjer so ugotavljali povezavo med genetskim zapisom antioksidantnih encimov in prognozo raka dojk, je bil omenjeni polimorfizem izbran kot

eden od označevalnih SNP (Tag SNP). Povezava med označevalnim SNP in prognozo raka dojk se ni izkazala za statistično značilno (37). Polimorfizem 73-1211G>A so preučevali tudi pri kitajski populaciji v povezavi z izgubo sluha zaradi hrupa, pri čemer niso našli značilne povezave (38).

1.3.1.2 Polimorfizmi v genu *SOD2*

V raziskavah so odkrili povezavo med genetskimi polimorfizmi za *SOD2* in številnimi boleznimi kot npr. rakava obolenja, nevrodegenerativne bolezni, sladkorno boleznijo tipa II in hipertenzijo (18, 39). Miši brez zapisa za gen *SOD2* so zaradi kardiomiopatije in nevrodegeneracije kmalu po rojstvu umrle (18).

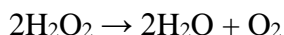
- *Polimorfizem 47A>G; Val16Ala (rs4880)*

MnSOD preko prenašalcev vstopi v mitohondrijski matriks, kjer se pretvori v aktivno obliko. Enonukleotidni polimorfizem 47A>G (rs4880) v zapisu za *SOD2* povzroči spremembo AK alanina v valin. Pri tem pride do spremembe v sekundarni strukturi encima, ki vpliva na učinkovitost prenosa preko mitohondrijske membrane. Protein, ki vsebuje AK valin, se zadrži v notranji membrani mitohondrija. Posledično ima ta oblika MnSOD 30-40 % zmanjšano aktivnost v primerjavi s proteinom, ki vsebuje AK alanin (40). Alel A je povezan tudi z zmanjšano stabilnostjo mRNA (41). Homozigot za genotip Val/Val je povezan z večjim tveganjem za pojav raka trebušne slinavke (OR = 1,96) (42) in diabetične nefropatije (OR = 1,32) (43) v primerjavi z genotipom Ala/Ala. Medtem ko so našli povezavo med genotipom Ala/Ala in večjim tveganjem za pojav raka želodca pri azijski (Chinese Han) populaciji (OR = 2,85) (36). V rezultatih študij se pojavljajo nasprotovanja v povezavi s polimorfizmom Ala16Val in povečanim tveganjem za različne bolezni. Večina jih poroča o povezavi med polimorfizmom *SOD2* in boleznimi kot so astma, Parkinsonova bolezen, shizofrenija, pljučni rak, rak prostate (18, 28). Te rezultate študij je težko primerjati, saj v večini upoštevajo različne faktorje (karakteristike vzorca, stopnja bolezni, zunanji faktorji itd.) (18). V nedavni študiji, ki je potekala v Sloveniji, so povezali polimorfizem Val16Ala s plazemsko koncentracijo dopamina in razmerjem reducirane in oksidirane oblike glutationa (GSH/GSSG) v polni krvi (28).

1.3.2 Katalaza

Funkcija katalaze je odstranjevanje H_2O_2 (enačba 2). Z razgradnjo H_2O_2 v H_2O in O_2 prepreči nastanek OH^\bullet (slika 6) (29).

Enačba 2



Katalaza je encim, ki je sestavljen iz štirih podenot, ki imajo Fe^{3+} -hem v aktivnih mestih. Nahaja se intracelularno predvsem v peroksisomih, manj v mitohondrijih (29, 30). Katalaze najdemo v različnih tkivih, najbolj aktivne pa so v jetrih, eritrocitih in ledvicah (29, 32).

Raziskava pri nosečnicah brez zapletov v primerjavi z zdravimi nenosečimi preiskovankami je pokazala porast aktivnosti CAT v polni krvi med nosečnostjo (44).

1.3.2.1 Polimorfizmi v genu *CAT*

Gen *CAT* se nahaja na 11 kromosomu (45). Posamezniki z zmanjšano aktivnostjo CAT imajo povečano incidenco bolezni povezanih z oksidativnim stresom, kot npr. ateroskleroza, sladkorna bolezen, dislipidemija, nevrodegenerativne bolezni, osteoporoza, itd. (46).

▪ *Polimorfizem -20T>C (rs1049982)*

V korejski študiji so analizirali povezavo polimorfizmov v genu *CAT* z mineralno kostno gostoto in biokemičnimi označevalci kostne premene pri postmenopavzalnih ženskah. Analiza je pokazala, da je haplotip HT₄ (-20T, +144C, +22348T, +33078A) signifikantno značilno povezan z višjo mineralno kostno gostoto na različnih mestih ($p < 0.001-0.03$) ter z nižano vrednostjo serumskega osteokalcina ($p = 0.01$) (46). Enonukleotidni polimorfizem -20T>C so preučevali tudi v povezavi s prognozo raka dojk, pri čemer je bil omenjeni polimorfizem izbran kot eden od označevalnih SNP (Tag SNP). Povezava med označevalnim SNP in prognozo raka dojk se ni izkazala za statistično značilno (37). Polimorfizem rs1049982, ki ga bomo preučevali v tej diplomski nalogi, se nahaja v 5'-UTR regiji (angl. *untranslated region*) (46).

Polimorfizmi v genskem zapisu omenjenih antioksidantnih encimov bi lahko vodili do reguliranja izražanja gena in nepravilnega izrezovanja intronov (SOD1), spremembe v sekundarni strukturi encima (SOD2), morebitnega vpliva na izražanje gena zaradi možnosti zaviranja vezave DNA polimeraze na promotorsko regijo v 5'-UTR predelu (*CAT*) in s tem posledično do znižanja znotrajcelične koncentracije teh encimov. Zaradi dejstva, da je škoda, povzročena s Hg, odvisna od znotrajcelične koncentracije antioksidantov (10), se nam zastavi vprašanje, ali bi polimorfizmi v zapisu SOD1, SOD2 in *CAT* encimov lahko vplivali na obseg škode povzročene po izpostavljenosti nosečnic Hg^{2+} in MeHg, posledično povešanemu oksidativnemu stresu, in s tem vplivali na razvoj otroka.

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti povezanost med polimorfizmi v genih *SOD1* (rs4998557), *SOD2* (rs4880) in *CAT* (rs1049982), celokupno koncentracijo Hg in koncentracijo MeHg, izmerjeno v različnih bioloških vzorcih (kri, lasje, mleko matere, popkovnična kri in urin novorojenčka), ter kognitivnim, jezikovnim in motoričnim razvojem otroka, ocenjenim s pomočjo Bayley-III lestvic zgodnjega razvoja pri starosti 18 mesecev. V primeru polimorfizma v genu *SOD1* (73-1211G>A) ima alel A morebiten vpliv na izražanje gena in nepravilno izrezovanje introna, v primeru polimorfizma v genu *SOD2* (47A>G) ima alel A vpliv na zmanjšano učinkovitost prenosa encima preko mitohondrijske membrane ter v primeru polimorfizma v genu *CAT* (-20T>C) ima alel C morebiten vpliv na izražanje gena in s tem na zmanjšano aktivnost encima. Če je zmanjšana antioksidativna obramba, v našem primeru na voljo manj antioksidantnih encimov (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*), lahko pričakujemo slabšo obrambo pred toksičnimi vplivi Hg in MeHg.

Delovne hipoteze:

- Nosilci alela A polimorfizma rs4998557 v genu *SOD1*, alela A polimorfizma rs4880 v genu *SOD2* in alela C polimorfizma rs1049982 v genu *CAT* so posamezniki s slabšimi ocenami nevrološkega razvoja (kognitivne, jezikovne in motorične funkcije).
- Višja koncentracija Hg in MeHg v različnih bioloških vzorcih je povezana s slabšimi ocenami nevrološkega razvoja otroka (kognitivne, jezikovne in motorične funkcije).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovana populacija

- Hrvaški vzorci: 212 mater in 178 novorojenčkov
- Slovenski vzorci: 430 novorojenčkov

V raziskavo smo tako vključili 212 vzorcev mater in 608 vzorcev novorojenčkov. Nosečnicam s Hrvaške so na kontrolnih pregledih odvzeli vzorce periferne venske krvi in las. Ob rojstvu otrok je bila odvzeta popkovnična kri in tkivni del popkovine. Odvzemi hrvaških vzorcev so bili opravljeni v Kliničkem bolniškem centru Klinike za ginekologijo in porodništvo v Reki. Odvzem tkivnih vzorcev popkovine pri slovenskih novorojenčkih je bil izveden v Porodnišnici Ljubljana. Za nadaljnje analize so bili vzorci krvi in popkovine shranjeni pri -20°C , vzorci las pa pri sobni temperaturi.

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

3.2 Določanje celokupne koncentracije Hg in koncentracije MeHg

Vse meritve koncentracij so bile izvedene na inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Koncentracije Hg v laseh (hHg), krvi (mHg), mleku (milkHg), popkovnični krvi (cordHg) in urinu novorojenčkov (buHg) so določili z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS). Metoda temelji na merjenju količine svetlobe, ki jo absorbira vzorec v plinastem stanju. Vzorce uparimo in atomiziramo s plamenom. Skozi plamen posvetimo s svetlobo ustrezne valovne dolžine in izmerimo delež prepuščene svetlobe. Meritve so bile izvedene na napravi Direct Mercury Analyzer (Milestone Srl, Italija) (47-49).

Koncentracije MeHg v laseh (hMeHg) so določili s plinskim kromatografom z detektorjem na zajetje elektronov (angl. *Gas Chromatography-Electron Capture Detector* oz. GC-ECD, HP 5890, Hewlett Packard, ZDA). Princip merjenja odziva temelji na nastanku aniona eluirane spojine zaradi obsevanja z beta delci. Koncentracije MeHg v venski krvi (mMeHg) in v popkovnični krvi (cordMeHg) so po predhodni ekstrakciji, etilaciji in ločitvi s plinsko kromatografijo določili z metodo atomske fluorescenčne spektrometrije hladnih par (angl. *Cold vapor-atomic fluorescence spectrometry* oz. CV-AFS, Brooks Rand Labs (Model I), ZDA) (47-49).

3.3 Izolacija DNK

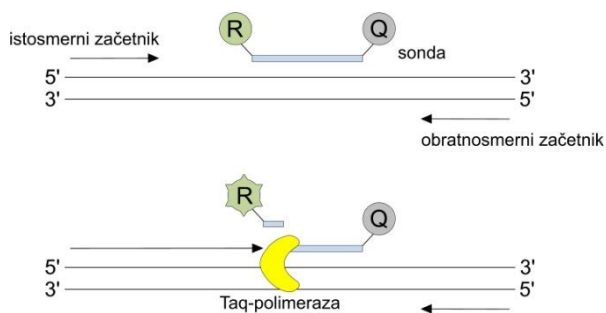
Genomska DNK nosečnic je že bila izolirana iz levkocitov periferne venske krvi, z uporabo kompleta High Pure PCR Template Preparation Kit, proizvajalca Roche.

Genomsko DNK novorojenčkov smo izolirali iz popkovnega tkiva. Izolacijo smo izvedli po protokolu *DNA purification from tissues* iz priročnika QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 04/2010 (50), pri čemer smo uporabili reagente iz kompleta QIAamp DNA Mini Kit proizvajalca QIAGEN, ZDA.

Vzorci izolirane DNK mater so bili nadaljnje redčeni z ultra čisto vodo, v razmerju 1:20. DNK novorojenčkov zaradi nižjih koncentracij nismo dodatno redčili. Takšne vzorce smo hranili pri temperaturi -20°C . Uspešnost izolacije smo preverili z meritvijo koncentracij izoliranih DNK vzorcev s spektrofotometrom NanoDrop (ND1000, ZDA). Pri tem smo merili absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. S količnikom izmerjenih absorbanc pri 260 in 280 nm, smo preverili še čistost izolirane DNK.

3.4 Genotipizacija z uporabo TaqMan sond

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR. Pomnoževanje in detekcija potekata sočasno in temeljita na merjenju fluorescence. Načinov za detekcijo produktov je več. V našem primeru smo uporabili hidrolizirajoče sonde TaqMan. Ta specifična sonda prepozna nukleotidno zaporedje in se v stopnji prileganja veže nanj. Označena je z dvema barviloma. Pri intaktni sondi je na 5' koncu vezano barvilo, ki emitira fluorescenco (R), na 3' koncu pa je vezano barvilo, ki le to fluorescenco prestreže (Q). Med podvojevanjem tarčnega dela DNK-polimeraza zaradi svoje



Slika 7: Uporaba hidrolizirajočih TaqMan sond [51]

endonukleazne aktivnosti razgradi sondo, pri tem se barvili ločita, ker se razdalja med njima poveča, dušilec ne prestreže več fluorescence reporterskega barvila, kar ima za posledico porast fluorescence, ki jo detektiramo (slika 7) (51).

V našem primeru smo uporabili dve različni poročevalski barvili: FAM[®] za prvi alel in VIC[®] za drugi alel. Vsaka sonda z različnim poročevalskim barvilom (FAM[®] ali VIC[®]) se namreč veže le na eno varianto alela.

3.5 Priprava vzorcev za PCR reakcijo v realnem času

3.5.1 Aparature in pribor uporabljeni pri eksperimentalnem delu

- laboratorijske rokavice brez smukca (Kimberly Clark, Texas, ZDA)
- avtoklav (Kambič, Semič, Slovenija)
- vsebniki s predhodno avtoklaviranimi nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- delovna komora za pripravo vzorcev za PCR z UV svetlobno sterilizacijo (Biosan DNA/RNA UV cleaner, Latvija)
- 3 % raztopina natrijevega hipoklorita
- centrifuga/vorteks (FVL-2400 N, Combi Spin, Biosan, Latvija)
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L; Eppendorf, Nemčija)
- multikanalni pipeti z 12 nastavki (0,5-10 μ L, 5-100 μ L, Eppendorf, Nemčija)
- epruvete s pokrovčkom (0,5 mL in 1,5 mL, Eppendorf, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 384 (16x24) vdolbinicami (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA)
- centrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- neprodušna samolepilna folija LightCycler® 480 Sealing foil, Roche, ZDA
- LightCycler® 480 II Real-Time PCR System, Roche, ZDA
- računalniški program Exor for research, 2011

3.5.2 Reagenti

- TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG, Applied Biosystem (vsebuje AmpliTaq Gold® ultračisto DNK polimerazo, dNTP, pufer optimizirane sestave in ROX pasivno referenco za normalizacijo reporterskega signala tekom analize)
- Solis BioDyne 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX)
- sonde TaqMan® SNP Genotyping
- destilirana H₂O (dH₂O)
- vzorci genomske DNK

3.5.3 Priprava vzorcev

Celotna priprava vzorcev je potekala v delovni komori. Pred pričetkom priprave vzorcev smo s 3 % natrijevim hipokloritom očistili delovno komoro, pipete, vsebnike s predhodno avtoklaviranimi nastavki za pipete ter steklene vsebnike z epruvetkami s pokrovčkom. Ves

pribor smo nato sterilizirali z UV svetlobo (vsaj 20 min). Nato smo prenesli DNK vzorce in dH₂O iz zamrzovalnika, da so se odtalili. Master Mix in sonde smo vzeli iz hladilnika oziroma zamrzovalnika tik pred uporabo. Ves čas dela smo bili zaščiteni z laboratorijsko haljo in rokavicami brez smukca. V komori smo po 20 minutah izklopili vir UV svetlobe ter pričeli s pripravo reakcijske zmesi za qPCR analizo po naslednjem protokolu:

Preglednica VI: Sestava reakcijske zmesi za qPCR reakcijo po protokolu za TaqMan[®] SNP Genotyping sonde v primeru uporabe Universal Master Mixa II

REAGENT	VOLUMEN [μL]
TaqMan [®] Universal Master Mix II	5
TaqMan [®] SNP Genotyping Assay C__3272740_10, C__8709053_10, C__1883211_10	0,25
dH ₂ O	3,75
genomska DNK	1
končni volumen reakcijske zmesi	10

Približno polovico analiz smo opravili po zgornjem protokolu. Iz praktičnih razlogov smo zamenjali obstoječi mastermix za Solis BioDyne 5x HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus, pri čemer smo sledili naslednjemu protokolu:

Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za qPCR reakcijo po protokolu za TaqMan[®] SNP Genotyping sonde v primeru uporabe Solis BioDyne 5x HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mixa Plus

REAGENT	VOLUMEN [μL]
Solis BioDyne 5x HOT FIREPol [®] Probe qPCR Mix Plus	2
TaqMan [®] SNP Genotyping Assay C__8709053_10, C__3272740_10, C__1883211_10	0,25
dH ₂ O	6,75
genomska DNK	1
končni volumen reakcijske zmesi	10

Zamenjava se pri izvajanju qPCR analize ni izkazala za problematično.

Da smo si olajšali delo, smo pripravili skupen volumen reagentov (brez genomske DNK) za želeno število vzorcev. Po dodatku vsakega reagenta smo zmes v epruvetki dobro premešali in centrifugirali. Nato smo s pomočjo multikanalne pipete prenesli po 9 μL pripravljene mešanice reagentov v vsako posamezno vdolbinico na mikrotitrski ploščici. V vsako izmed teh vdolbinic smo nato z multikanalno pipeto dodali po 1 μL DNK vzorcev (1 vdolbinica = 1 vzorec DNK). Za slepi vzorec smo v 2 vdolbinici namesto 1 μL DNK dodali 1 μL dH₂O.

Odsotnost pomnoževanja v slepem vzorcu je v našem primeru pomenila, da je reakcija specifična oz. da med pripravo vzorcev ni prišlo do kontaminacije z DNK vzorcev.

Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščico smo prekrili z neprodušno samolepilno folijo s čimer smo še dodatno preprečili možnost nadaljnje kontaminacije vzorcev med samim potekom reakcije. Po centrifugiranju mikrotitrskes ploščice smo le-to prenesli v qPCR komoro LightCycler®.

▪ TaqMan® SNP Genotyping sonde

Za polimorfizem 73-1211G>A; SNP ID rs4998557 (52):

ID številka sonde C__3272740_10

Sekvenčni okvir ([VIC/FAM]):

CATTACCTGAATGGCTATACTGCTT[A/G]CTTTCATTTTGGTAGAGTGGAAAGG

Za polimorfizem 47A>G; SNP ID rs4880 (53):

ID številka sonde C__8709053_10

Sekvenčni okvir ([VIC/FAM]):

CTGCCTGGAGCCCAGATACCCCAA[A/G]CCGGAGCCAGCTGCCTGCTGGTGCT

Za polimorfizem -20T>C; SNP ID rs1049982 (54):

ID številka sonde C__1883211_10

Sekvenčni okvir ([VIC/FAM]):

CGAGCCGAGGCCTCCTGCAGTGTT[C/T]GCACAGCAAACCGCACGCTATGGCT

3.5.4 Potek PCR reakcije v realnem času

V LightCycler-ju smo zagnali temperaturni program kot ga narekuje proizvajalec. Predstavljen je v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Temperaturni program PCR reakcije v realnem času

FAZA REAKCIJE	TEMPERATURA	ČAS	ŠTEVILO CIKLOV
preinkubacija/začetna denaturacija	95 °C	10 minut*	1
denaturacija	95 °C	15 sekund	50
prileganje/podaljševanje komplementarne verige DNK	60 °C	60 sekund	

*v primeru Solis BioDyne 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus smo čas preinkubacije po navodilu proizvajalca podaljšali na 15 minut

Po končani PCR analizi smo v računalniškem programu *Exor for research 2011* obdelali rezultate in določili genotip za vsak posamezen vzorec.

3.6 Bayley-III lestvice zgodnjega razvoja

Z lestvicami zgodnjega razvoja Nancy Bayley ugotavljamo otrokov zgodnji razvoj na kognitivnem, jezikovnem/komunikacijskem, motoričnem, čustvenem in vedenjskem področju. Namenjene so dojenčkom in otrokom od 1 do 42 mesecev starosti. Lestvice zgodnjega razvoja N. Bayley-III (BSID-III) so standardiziran merski pripomoček, s katerim ocenjujejo trenutno razvojno stanje otrok. Rezultat na testu BSID-III nam nudi zanesljivo in veljavno informacijo o otrokovi razvojni ravni v primerjavi z njegovimi vrstniki. Test je namenjen ugotavljanju morebitnega razvojnega zaostanka v najzgodnejšem razvojnem obdobju. Uporaba (izvedba, vrednotenje in razlaganje rezultatov) je zaradi strokovnih zahtev omejena na univerzitetne diplomirane psihologe (55).

BSID-III je sestavljen iz 5. lestvic: kognitivne (COG), jezikovne (LANG), ki se nadalje deli na razumevanje (RC-*receptive*) in izražanje (EC-*expressive*), motorične (MOT), ki se deli na fino (FM-*fine*) in grobo (GM-*gross*) motoriko, lestvice socialne čustvenosti (angl. *social emotional*) ter lestvice prilagojenega vedenja (angl. *adaptive behavior*). Število možnih točk za posamezno lestvico je predstavljeno v preglednici IX.

Preglednica IX: Število možnih točk pri posamezni lestvici Bayley-III testa

LESTVICA	ŠTEVILO PREDMETOV/TOČK
kognitivna (COG)	91
jezikovna (LANG):	97
- izražanja (EC)	48
- razumevanja (RC)	49
motorična (MOT):	138
- fine motorike (FM)	66
- grobe motorike (GM)	72
socialne čustvenosti	vprašalnik, ki ga izpolni starš/oskrbnik
prilagojenega vedenja	vprašalnik, ki ga izpolni starš/oskrbnik

V našem primeru je bilo trenutno razvojno stanje otrok ocenjeno pri 18 (razpon 16-20) mesecih. Vsaka naloga/predmet je bil/a ocenjen/a z 1 točko (1-opravljen; 0-ni opravljen). Sešteli smo točke Bayley-III testa za vsako področje posebej. Rezultati slovenskih otrok so bili preračunani v standardne vrednosti (angl. *composite score*), aritmetična sredina teh vrednosti je 100, standardna deviacija 15 ter v rezultate v obliki lestvice (angl. *scaled score*), aritmetična sredina 10, standardna deviacija 3. Pri analizi smo upoštevali rezultate COG, LANG (EC, RC) in MOT (FM, GM) lestvice.

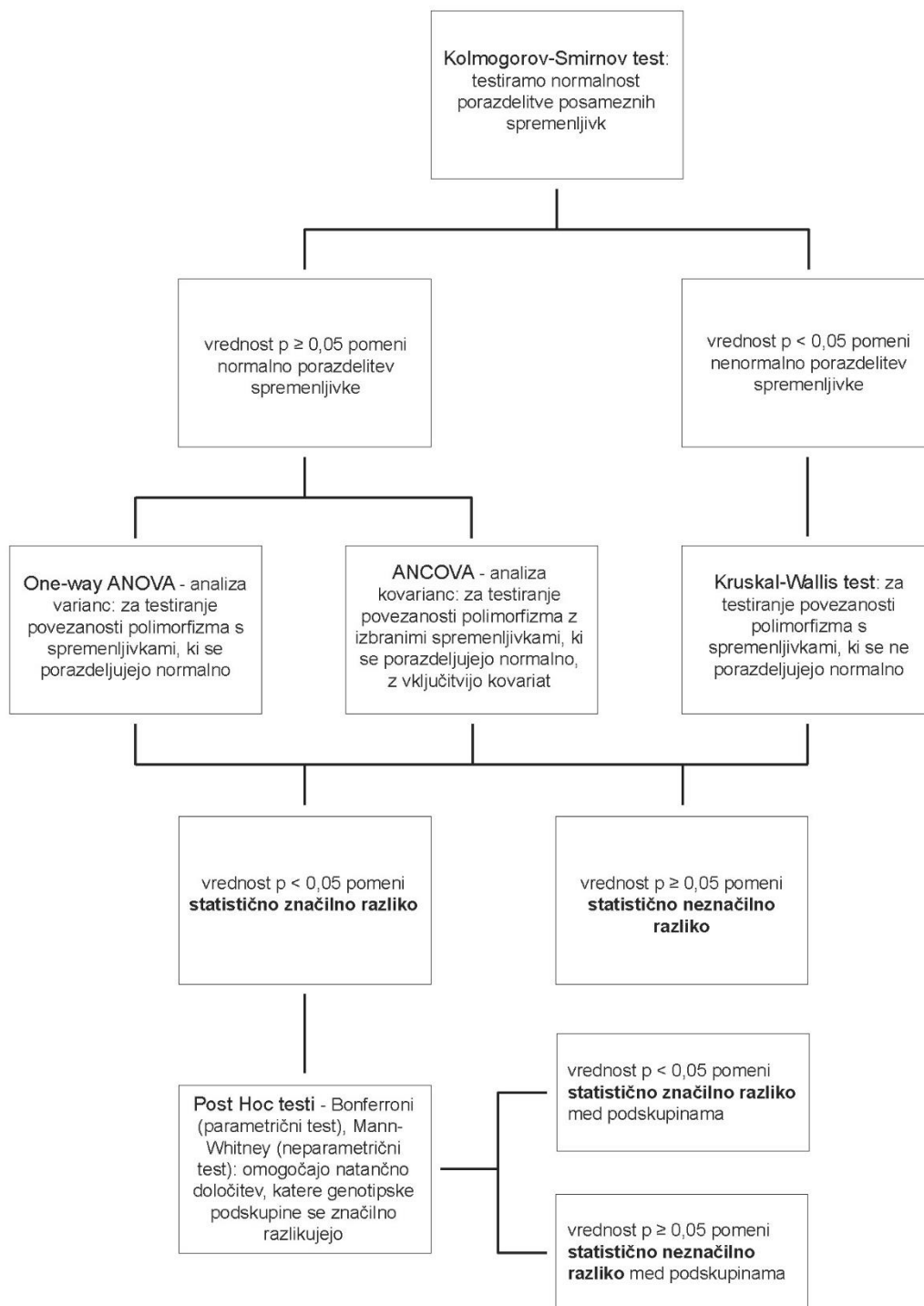
Standardne vrednosti (angl. *composite score*) 130 točk in več pomeni zelo dobro (angl. *very superior*), medtem ko je rezultat 69 točk in manj izjemno nizek (angl. *extremely low*) (56).

Koeficienti zanesljivosti, izračunani z uporabo Fisher-jeve z transformacije, znašajo za COG lestvico 0,91, lestvice RC 0,87, EC 0,91, FM 0,86, GM 0,91, LANG 0,93 ter MOT lestvico 0,92 (57).

3.7 Statistične metode

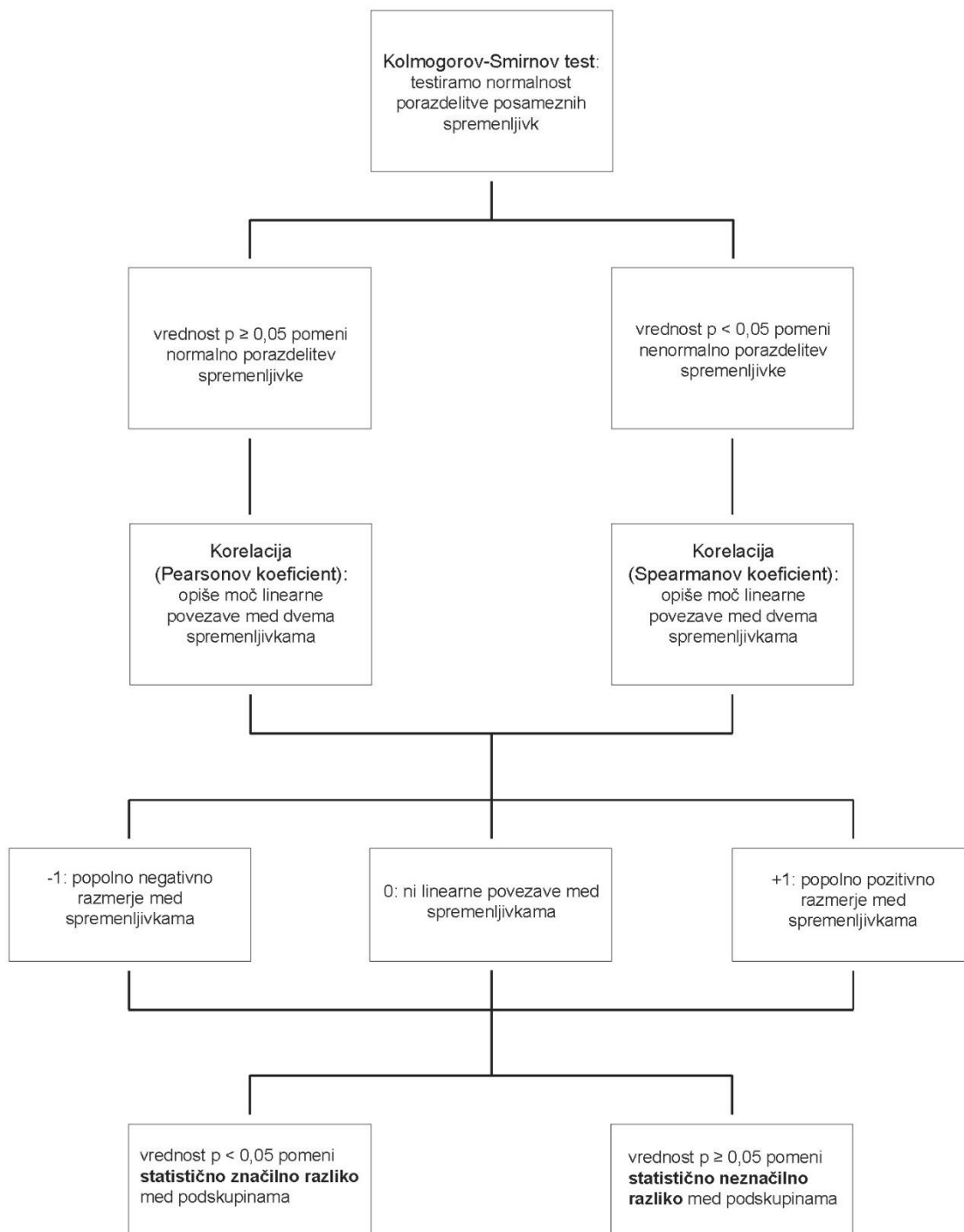
Za statistično analizo podatkov smo uporabili program SPSS Statistics 21.0. Analizo smo izvajali v skladu z algoritmom, ki ga predstavljata **sliki 8 in 9**.

a) v primeru nominalne neodvisne spremenljivke



Slika 8: Algoritem statističnih testov, ki smo jih izvajali v primeru nominalne neodvisne spremenljivke (58)

b) v primeru intervalnih spremenljivk



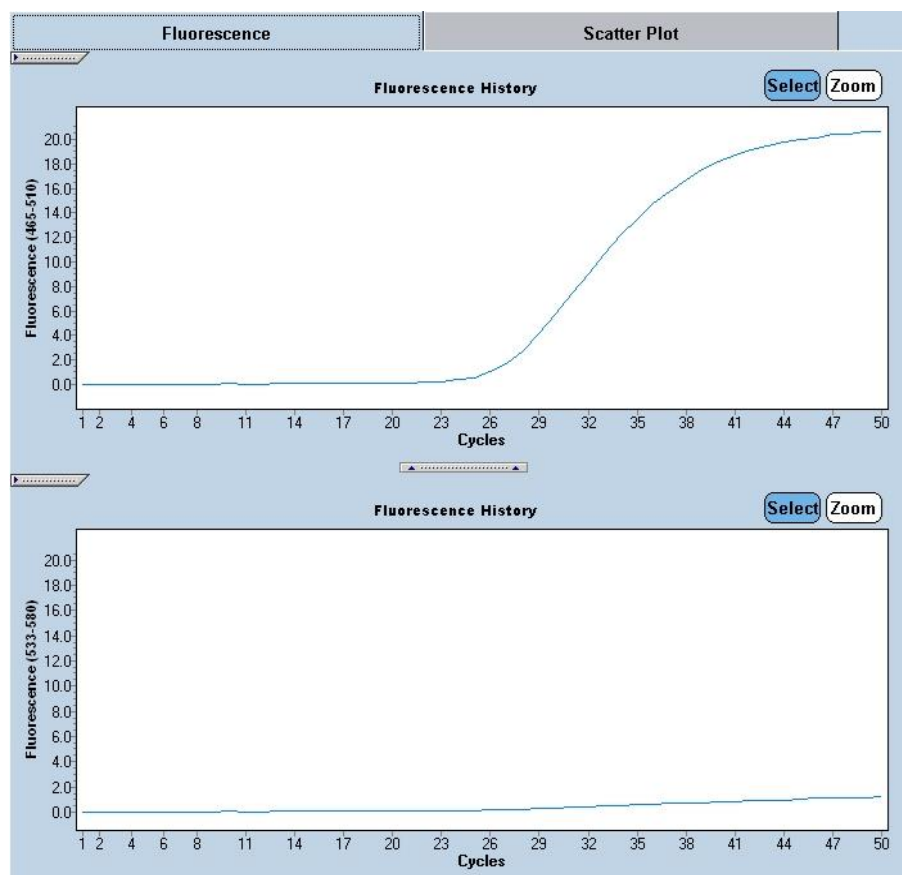
Slika 9: Algoritem statističnih testov, ki smo jih izvajali v primeru intervalnih spremenljivk (58)

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Genotipizacija in interpretacija rezultatov

Fluorescenčni barvili FAM[®] (valovna dolžina emitirane svetlobe je med 465 in 510 nm) in VIC[®] (valovna dolžina emitirane svetlobe je med 535 in 580 nm) s povečanjem fluorescence med postopkom podvojevanja DNK podata odgovor, kateri alel je prisoten v vzorcu. Rezultat genotipizacije predstavljajo tri možne različice, prikazane na **slikah 10, 11 in 12**.

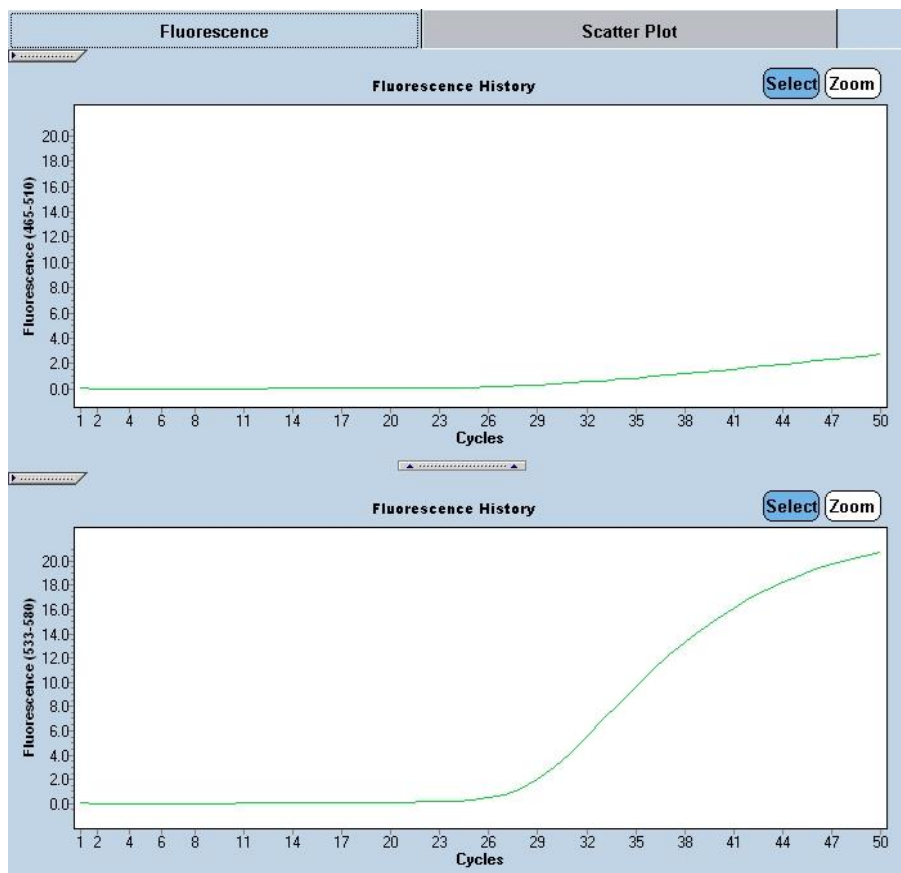
1) homozigot za alel 1: porast fluorescence le za barvilo FAM[®]



Slika 10: Krivulji fluorescence po končani qPCR reakciji. Odziv pri valovni dolžini 465-510 nm (barvilo FAM[®]) je dokaz za prvo homozigotno različico alela

V primeru polimorfizma rs4998557 (73-1211G>A) in polimorfizma rs4880 (47A>G) je takšen rezultat pomenil prisotnost genotipa GG, pri polimorfizmu rs1049982 (-20T>C) pa prisotnost genotipa TT.

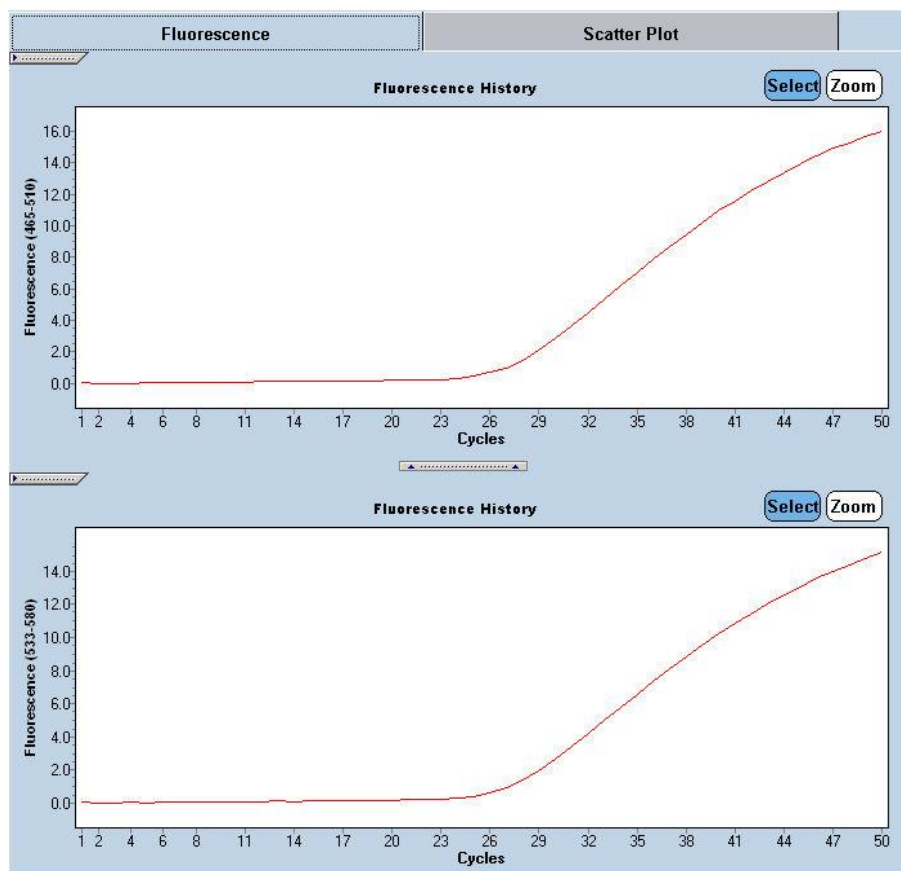
2) homozigot za alel 2: porast fluorescence le za barvilo VIC®



Slika 11: Krivulji fluorescence po končani qPCR reakciji. Odziv pri valovni dolžini 535-580 nm (barvilo VIC®) je dokaz za drugo homozigotno različico alela

V primeru polimorfizma rs4998557 (73-1211G>A) in polimorfizma rs4880 (47A>G) je takšen rezultat pomenil prisotnost genotipa AA, pri polimorfizmu rs1049982 (-20T>C) pa prisotnost genotipa CC.

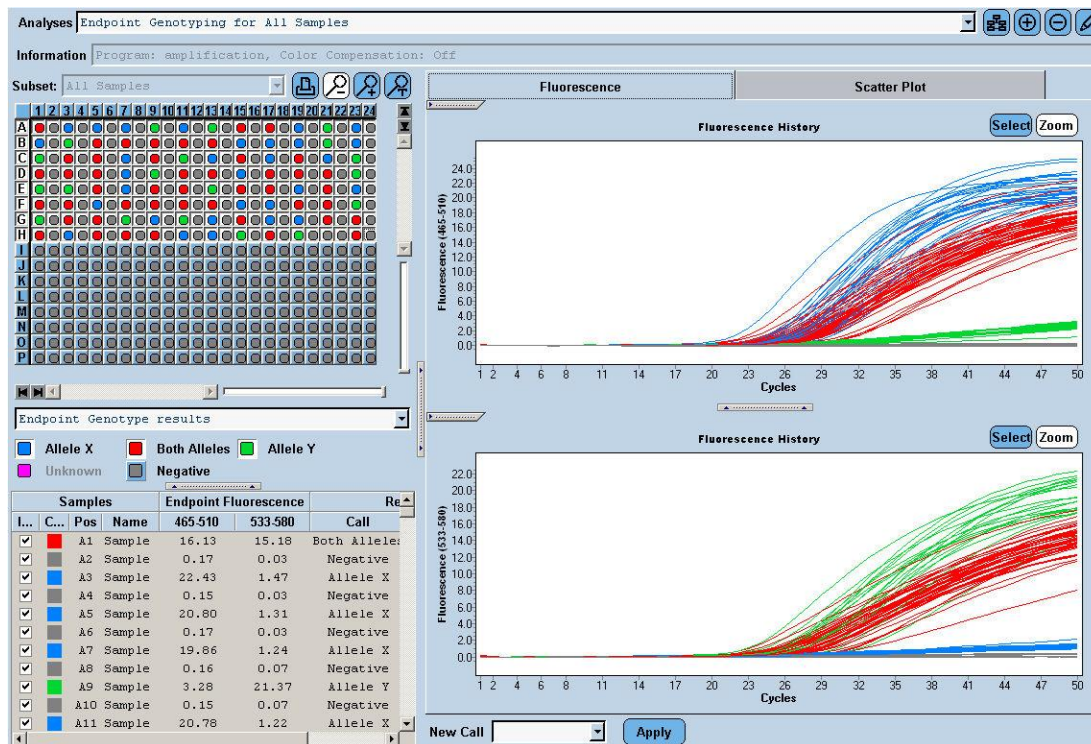
3) heterozigot: porast fluorescence za obe barvili



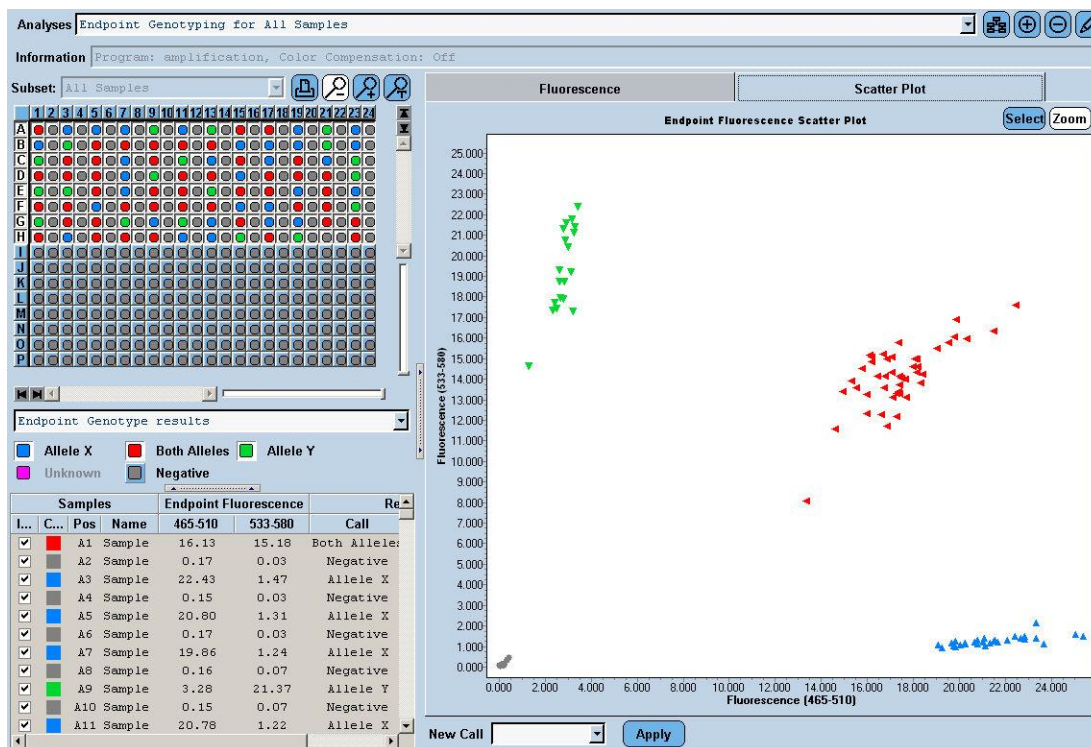
Slika 12: Krivulji fluorescence po končani qPCR reakciji. Odziv pri obeh valovnih dolžinah je dokaz za heterozigotno različico alela

V primeru polimorfizma rs4998557 (73-1211G>A) in polimorfizma rs4880 (47A>G) je takšen rezultat pomenil prisotnost genotipa AG, pri polimorfizmu rs1049982 (-20T>C) pa prisotnost genotipa CT.

Na slikah 10, 11 in 12 so prikazane krivulje fluorescence v odvisnosti od števila ciklov za posamezen vzorec. Na **sliki 13** pa je predstavljen končni rezultat alelne diskriminacije za 96 vzorcev tj. krivulje fluorescence za obe barvili. V mreži (A-H)x(1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23) so homozigoti, kjer dobimo odziv barvila VIC[®], označeni z zeleno, homozigoti, kjer dobimo odziv barvila FAM[®], z modro, heterozigoti, kjer dobimo odziv obeh barvil, pa z rdečo barvo pike. Slepa vzorca A24 in B24, kjer ni zaznati fluorescence, predstavljata piki sive barve. Pri vzorcu H21 ni zaznati fluorescence zato je bila potrebna ponovna izolacija DNK. Na **sliki 14** so rezultati analize predstavljeni še v obliki grafa razpršenosti.



Slika 13: Končni rezultat genotipizacije po qPCR reakciji – prikaz krivulj fluorescence



Slika 14: Končni rezultat genotipizacije po qPCR reakciji – graf razpršenosti

4.2 Genotipske frekvence polimorfizmov v skupinah preiskovancev

Analizirana populacija (212 nosečnic/mater s Hrvaške in 608 novorojenčkov/otrok s Hrvaške in iz Slovenije) je bila vključena v del študije evropskega FP6 iz projekta PHIME (*»Public Health Impact of Long-term, Low-level Mixed Element Exposure in Susceptible Population Strata«*), ki pri nosečnicah in otrocih iz različnih evropskih držav ocenjuje vpliv dolgotrajne izpostavljenosti toksičnim kovinam v nizkih odmerkih.

Pridobljene frekvence genotipov za vse otroke smo vstavili v Hardy-Weinbergovo (HW) enačbo (enačba 3).

$$\begin{aligned} \text{Enačba 3} \quad & p^2 + 2pq + q^2 = 1 \\ & (p + q = 1) \end{aligned}$$

pri čemer so členi kvadratne enačbe frekvence (f) posameznega genotipa: $f(\text{AA}) = p^2$

$$f(\text{Aa}) = 2pq$$

$$f(\text{aa}) = q^2$$

HW načelo predpostavlja, da pogostost pojavljanja posameznih alelov in genotipov v določeni populaciji ostaja konstantno, če je prisotno naključno parjenje, ni selekcijske preference za kateri koli genotip ali proti kateremu koli genotipu (naključna selekcija), ne prihaja do imigracije in emigracije populacije. Predpostavlja tudi neskončno veliko populacijo in odsotnost mutacij (59).

S pomočjo kalkulatorja za računanje HW ravnotežja na spletu (OEGE - *Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*) smo primerjali rezultate pričakovanih frekvenc in opazovanih frekvenc vseh novorojenčkov za dane polimorfizme rs4998557 (*SOD1*), rs4880 (*SOD2*), rs1049982 (*CAT*). Te podatke smo nato uporabili pri X^2 testu. V preglednicah X, XI in XII je predstavljena pogostost posameznih genotipov preučevanih polimorfizmov in skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HW_r).

Preglednica X: Pogostost posameznih genotipov polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) in skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWr) (60, 61)

Genotip <i>SOD1</i>	CRO matere (N = 201)	CRO otroci (N = 178)	SLO otroci (N = 430)	CRO & SLO otroci (N = 608)
GG	158 (78,6 %)	135 (75,8 %)	335 (77,9 %)	470 (77,3 %)
AG	40 (19,9 %)	41 (23,0 %)	95 (22,1 %)	136 (22,4 %)
AA	3 (1,5 %)	2 (1,1 %)	0	2 (0,3 %)
Skladnost s HWr				p = 0,0545 ($X^2 = 5,82$)

Preglednica XI: Pogostost posameznih genotipov polimorfizma rs4880 (*SOD2*) in skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWr) (60, 61)

Genotip <i>SOD2</i>	CRO matere (N = 196)	CRO otroci (N = 178)	SLO otroci (N = 430)	CRO & SLO otroci (N = 608)
GG	58 (29,6 %)	55 (30,9 %)	111 (25,8 %)	166 (27,3 %)
AG	96 (49,0 %)	84 (47,2 %)	229 (53,3 %)	313 (51,5 %)
AA	42 (21,4 %)	39 (21,9 %)	90 (20,9 %)	129 (21,2 %)
Skladnost s HWr				p = 0,7122 ($X^2 = 0,68$)

Preglednica XII: Pogostost posameznih genotipov polimorfizma rs1049982 (*CAT*) in skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWr) (60, 61)

Genotip <i>CAT</i>	CRO matere (N = 203)	CRO otroci (N = 177)	SLO otroci (N = 430)	CRO & SLO otroci (N = 607)
GG	84 (41,4 %)	72 (43,6 %)	202 (47,0 %)	282 (46,5 %)
AG	97 (47,8 %)	78 (47,3 %)	178 (41,4 %)	259 (42,7 %)
AA	22 (10,8 %)	15 (9,1 %)	50 (11,6 %)	66 (10,9 %)
Skladnost s HWr				p = 0,8533 ($X^2 = 0,32$)

Test X^2 oz. hi-kvadrat nam pove, ali se eksperimentalno ugotovljene frekvence genotipov razlikujejo od pričakovanih frekvenc v populaciji. Ker je pri vseh treh testih p vrednost večja od 0,05, ne moremo govoriti o statistično značilnih razlikah med opazovanimi in pričakovanimi frekvencami in lahko zaključimo, da je preiskovana populacija otrok v HW ravnotežju.

Želeli smo ugotoviti, ali se pogostnost določenega genotipa pri izbranih preiskovanih polimorfizmih ujema s pogostnostjo posameznih genotipov pri Evropejcih (preglednica XIII). Glede na dobljene rezultate naše študije se pogostnosti posameznih genotipov ne ujemajo. X^2 test za polimorfizem rs4998557 (*SOD1*) ni zanesljiv zaradi zelo nizke frekvence genotipa AA (N = 2). Eksperimentalna vrednost p za polimorfizem rs4880 (*SOD2*) znaša 0,0456 ($X^2 = 6,18$), za polimorfizem rs1049982 (*CAT*) pa 0,0048 ($X^2 = 10,70$). Vrednost p < 0,05 pomeni, da se opazovane frekvence razlikujejo od pričakovanih. Vzrok

bi lahko bil, da smo v našem primeru analizirali le slovensko in hrvaško populacijo otrok in vzorec ni bil dovolj primerljiv s skupino Evropejcev.

Preglednica XIII: Primerjava frekvence genotipov za preučevane polimorfizme v naši raziskavi z genotipskimi frekvencami v drugih populacijah

Etnična skupina	rs4998557 (SOD1)			Etnična skupina	rs4880 (SOD2)			Etnična skupina	rs1049982 (CAT)		
	GG	AG	AA		GG	AG	AA		CC	CT	TT
Slovenci in Hrvati (n = 608; naša študija)	77,3	22,4	0,3	Slovenci in Hrvati (n = 608; naša študija)	27,3	51,5	21,2	Slovenci in Hrvati (n = 607; naša študija)	46,5	42,7	10,9
Evropejci (n = 226)	77,0	21,2	1,8	Evropejci (n = 226)	22,1	45,1	32,7	Evropejci (n = 46)	47,8	47,8	4,3
Evropejci (n = 120)	78,3	20,0	1,7	Evropejci (n = 108)	14,8	50,0	35,2				
Azijci (n = 86)	25,6	44,2	30,2	Azijci (n = 84)	2,4	19,0	78,6	Azijci (n = 46)	26,1	34,8	39,1
Azijci (n = 172)	30,2	47,7	22,1	Azijci (n = 172)	1,2	19,8	79,1				
Afro-Američani (n = 124)	29,0	56,5	14,5	Afro-Američani (n = 120)	25,0	50,0	25,0	Afro-Američani (n = 46)	47,8	39,1	13,0
Sub-Saharski Afričani (n = 226)	25,7	53,1	21,2	Sub-Saharski Afričani (n = 226)	14,2	47,8	38,1				

Opomba: Rezultati so podani v odstotkih (%)

V preglednicah XXVIII in XXIX v poglavju 7. Priloge so predstavljeni rezultati genotipizacije pri nosečnicah in novorojenčkih s Hrvaške in iz Slovenije.

Imeli smo 608 vzorcev otrok, katere smo genotipizirali za tri polimorfizme. Uspešno je bilo izvedenih 1823 od 1824 genotipizacij (učinkovitost = 99,95 %).

V preglednicah XXX, XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV, XXXVI, XXXVII in XXXVIII (glej poglavje 7. Priloge) so predstavljene povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanih polimorfizmov pri hrvaških otrocih in materah ter pri slovenskih otrocih.

V preglednicah XXXIX in XL (glej poglavje 7. Priloge) so predstavljene povprečne koncentracije Hg_{cel} in MeHg, izmerjene pri hrvaških otrocih in materah ter pri slovenskih materah.

4.3 Statistična analiza

4.3.1 Ugotavljanje povezanosti genetskih polimorfizmov z nevrološkim razvojem otroka

Zanimalo nas je, ali tri različne genotipske skupine pri polimorfizmih rs4998557 (73-1211G>A; *SOD1*), rs4880 (47A>G; *SOD2*) in rs1049982 (-20T>C; *CAT*) povzročijo statistično značilno razliko v kognitivni (COG), jezikovni (LANG, RC, EC) in/ali motorični (MOT, FM, GM) funkciji otroka, ocenjeni z lestvicami zgodnjega razvoja N. Bayley-III (BSID-III). Najprej smo preverili normalnost porazdelitve rezultatov BSID-III z neparametričnim testom Kolmogorov-Smirnov. Pri rezultatih testa, ki so se v populaciji hrvaških/slovenskih otrok porazdeljevali normalno, smo nadaljevali s testom ANOVA, pri rezultatih BSID-III, ki se niso porazdeljevali normalno, pa z neparametričnim testom Kruskal-Wallis (K-W).

Postavili smo ničelno hipotezo: povprečne vrednosti rezultatov BSID-III med genotipskimi podskupinami so enake, kar pomeni, da preučevani polimorfizem ni povezan z rezultati BSID-III za COG, LANG (RC, EC) in MOT (FM, GM) funkcijo otroka. Primerjali smo srednje vrednosti med tremi genotipskimi podskupinami za vse tri preučevane polimorfizme. Rezultat statističnega testa je vrednost p , ki je merilo signifikantnosti. Vrednost p , ki je manjša od 0,05, dokazuje statistično značilno razliko med genotipskimi podskupinami in je v preglednicah označena krepko. Rezultati testov one-way ANOVA in K-W so povzeti v preglednicah XIV in XV.

a) Ocena povezanosti genetskih polimorfizmov v skupini hrvaških (CRO) otrok

Preglednica XIV: Rezultati testov ANOVA in Kruskal-Wallis za vse tri polimorfizme pri hrvaških otrocih

POLIMORFIZEM FUNKCIJA	rs4998557 <i>SOD1</i> *	rs4880 <i>SOD2</i>	rs1049982 <i>CAT</i>
CRO otroci	p (N = 121)	p (N = 121)	p (N = 120)
COG (ANOVA)	0,639	0,268	0,057
RC (ANOVA)	0,401	0,202	0,637
EC (ANOVA)	0,314	0,344	0,150
LANG (ANOVA)	0,287	0,212	0,235
FM (ANOVA)	0,347	0,994	0,857
GM (K-W test)	0,596	0,657	0,242
MOT (ANOVA)	0,560	0,761	0,273
COG*LANG*MOT ^Δ (ANOVA)	0,434	0,247	0,064

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična; K-W: Kruskal-Wallis

^Δ pomnožene vrednosti COG, LANG in MOT funkcije otroka (interakcije)

* pri polimorfizmu rs4998557 (*SOD1*) ni bilo prisotne genotipske različice AA, zato smo namesto testa ANOVA uporabili t-test in namesto K-W testa Mann-Whitney test za primerjavo dveh neodvisnih skupin (GG in AG)

Iz preglednice XIV je razvidno, da v nobenem od zgornjih primerov ne moremo zavreči ničelne hipoteze in lahko zaključimo, da razlike med genotipskimi podskupinami v vrednostih nevroloških parametrov niso značilne. To kaže na to, da preučevani polimorfizmi v genih *SOD1*, *SOD2* in *CAT* ne vplivajo na nevrološki razvoj otrok s Hrvaške.

Vrednosti p, ki so bile med 0,05 in 0,10, smo obravnavali kot mejno signifikantne in tudi pri njih, tako kot pri statistično značilnih, v kasnejših testih upoštevali še vpliv sočasnih spremenljivk (kovariat).

b) Ocena povezanosti genetskih polimorfizmov v skupini slovenskih (SLO) otrok

Preglednica XV: Rezultati testov ANOVA in Kruskal-Wallis za vse tri polimorfizme pri slovenskih otrocih

POLIMORFIZEM FUNKCIJA	rs4998557 <i>SOD1</i> *	rs4880 <i>SOD2</i>	rs1049982 <i>CAT</i>
SLO otroci	p (N = 251)	p (N = 251)	p (N = 251)
COG (K-W test)	0,854	0,001	0,908
RC (K-W test)	0,471	0,031	0,762
EC (K-W test)	0,624	0,551	0,272
LANG (ANOVA)	0,887	0,074	0,434
FM (K-W test)	0,040	0,890	0,783
GM (K-W test)	0,486	0,252	0,687
MOT (K-W test)	0,041	0,571	0,590
COG*LANG*MOT ^Δ (ANOVA)	0,566	0,013	0,572

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična; K-W: Kruskal-Wallis

^Δ pomnožene vrednosti COG, LANG in MOT funkcije otroka (interakcije)

* pri polimorfizmu rs4998557 (*SOD1*) ni bilo prisotne genotipske različice AA, zato smo namesto testa ANOVA uporabili t-test in namesto K-W testa Mann-Whitney test za primerjavo dveh neodvisnih skupin (GG in AG)

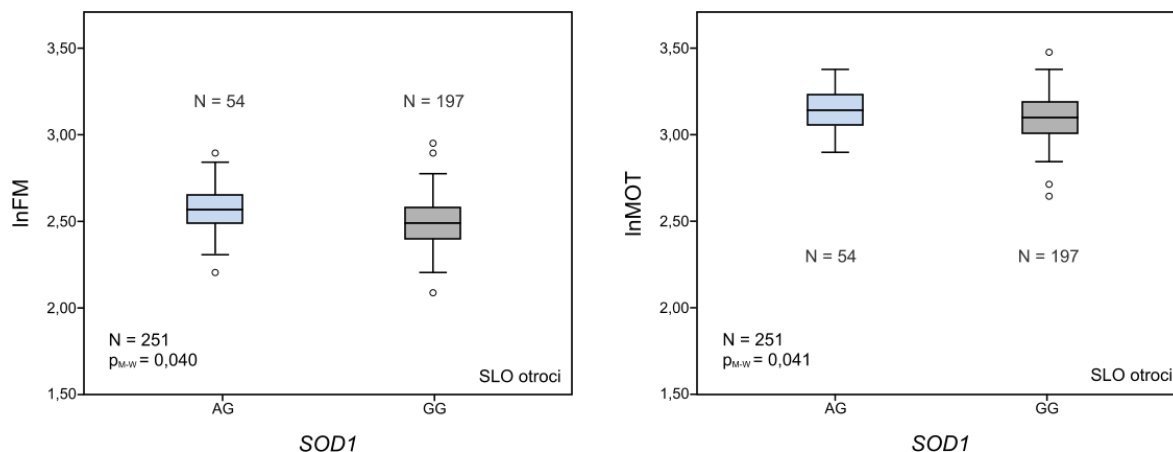
Iz preglednice XV je razvidno:

1. vrednosti ocen fine motorike (FM) in motorične (MOT) funkcije otroka so značilno različne med genotipskimi podskupinami polimorfizma rs4998557 (*SOD1*)
2. vrednosti ocene kognitivne (COG) funkcije in funkcije razumevanja (RC) otroka so značilno različne med genotipskimi podskupinami polimorfizma rs4880 (*SOD2*)
3. pomnožene vrednosti kognitivne, jezikovne in motorične (COG*LANG*MOT) funkcije otroka se razlikujejo med genotipskimi podskupinami polimorfizma rs4880 (*SOD2*)

Da bi ugotovili, kako sta dana polimorfizma povezana z ocenami razvojnih funkcij otroka, smo izvedli Post-Hoc analizo.

4.3.1.1 Post-Hoc analiza

Na **sliki 15** je prikazana primerjava ocen za funkcijo FM in MOT funkcijo med genotipskima podskupinama GG in AG polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) pri slovenskih otrocih.



Slika 15: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti rezultatov med genotipoma GG in AG polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) za BSID-III (LN vrednosti funkcije fine motorike (FM) - levo, motorične funkcije (MOT) - desno) slovenskih otrok ter p vrednost Mann-Whitney (M-W) testa

Otroci z genotipom GG imajo značilno nižje vrednosti ocene motoričnih funkcij. Ta rezultat se ni izkazal v skladu z našimi pričakovanji, saj smo predpostavili, da bodo nosilci alela A polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) izkazali slabše rezultate nevroloških funkcij. Razlog bi lahko tičal v odsotnosti genotipa AA v naši skupini preiskovancev ali v majhnem številu vzorcev.

Da bi pri testu ANOVA za COG funkcijo in pomnožene vrednosti COG*LANG*MOT funkcij hrvaških otrok ter LANG funkcijo in pomnožene vrednosti COG*LANG*MOT funkcij slovenskih otrok odkrili, med katerimi pari genotipskih podskupin obstaja značilna razlika v srednjih vrednostih rezultatov BSID-III, smo naredili še Bonferroni Post-Hoc test (preglednici XVI in XVII). Rezultate testov, ki so pokazali statistično značilne razlike med genotipskimi podskupinami, smo grafično prikazali v obliki diagramov »škatle z ročaji« na **slikah 16, 17 in 18**.

Preglednica XVI: Rezultati Bonferroni Post-Hoc testa za polimorfizem rs1049982 (*CAT*) pri hrvaških otrocih

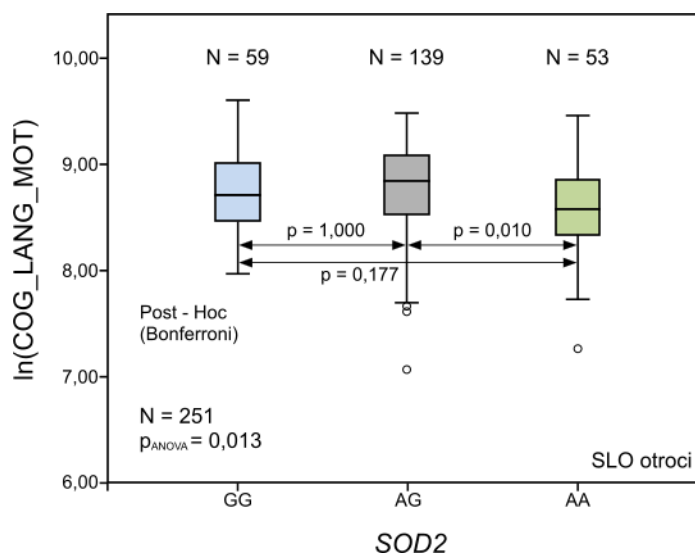
CRO otroci	rs1049982 <i>CAT</i>		Post-Hoc (Bonferroni)		
	p	N	CC-CT	CC-TT	TT-CT
funkcija					
COG (ANOVA)	0,057	120	0,282	0,093	0,781
COG*LANG*MOT (ANOVA)	0,064	120	0,379	0,089	0,653

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; LANG: jezikovna; MOT: motorična

Preglednica XVII: Rezultati Bonferroni Post-Hoc testa za polimorfizem rs4880 (*SOD2*) pri slovenskih otrocih

SLO otroci	rs4880 <i>SOD2</i>		Post-Hoc (Bonferroni)		
funkcija	p	N	GG-AG	GG-AA	AA-AG
LANG (ANOVA)	0,074	251	1,000	0,647	0,069
COG*LANG*MOT (ANOVA)	0,013	251	1,000	0,177	0,010

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; LANG: jezikovna; MOT: motorična



Slika 16: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti rezultatov med genotipi GG, AG, AA polimorfizma *SOD2* za BSID-III (LN vrednosti pomnoženih vrednosti COG*LANG*MOT funkcije) slovenskih otrok ter p vrednost testa ANOVA in Bonferroni Post-Hoc test

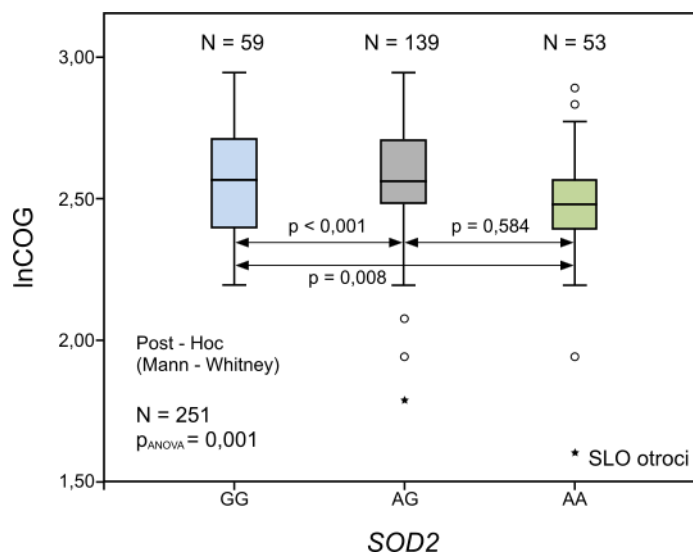
Glede na Bonferroni Post-Hoc test smo pokazali, da se rezultati produkta COG*LANG*MOT funkcij med seboj značilno razlikujejo med genotipoma AA in AG, pri čemer imajo otroci z genotipom AA značilno nižje vrednosti produkta COG*LANG*MOT funkcij. To potrjujejo tudi povprečne vrednosti pri posameznem genotipu, prikazane v preglednici XXXVII v poglavju 7. Priloge. Glede na našo začetno predpostavko, bi pričakovali, da bi se med seboj razlikovali tudi rezultati med genotipoma GG in AA, in sicer, da bi imeli otroci z genotipom AA značilno nižje vrednosti ocene nevroloških funkcij. Razlog, da nismo zaznali te razlike med genotipskima podskupinama, bi lahko bil ta, da smo za odvisno spremenljivko izbrali produkt COG, LANG in MOT funkcije. Polimorfizem rs4880 v genu *SOD2* ni značilno povezan z vsako izmed teh posameznih funkcij, kar bi lahko zakrilo morebitno razliko med genotipoma GG in AA.

Da bi pri testu K-W odkrili (v primeru COG funkcije, funkcije RC slovenskih otrok), med katerimi pari genotipskih skupin obstaja značilna razlika v srednjih vrednostih rezultatov BSID-III testa, smo naredili Mann-Whitney (M-W) teste (preglednica XVIII). Vrednost p (0,05) smo delili s številom M-W testov, ki smo jih izvršili – v našem primeru 3: AA-AG, AG-GG, AA-GG (Bonferronijeva korekcija). Signifikantna vrednost p se je tako znižala na vrednost 0,0167 (0,05/3). Tako se napaka 1. reda ne povečuje. Diagrami (»škatle z ročaji«) so prikazani na **slikah 17 in 18**.

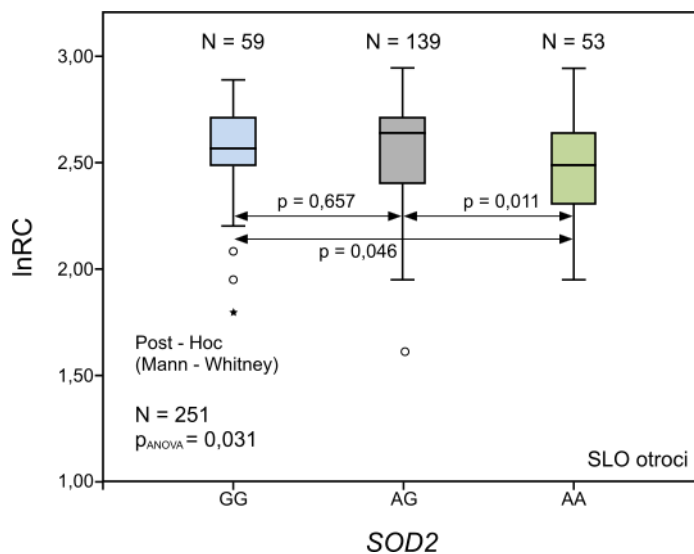
Preglednica XVIII: Rezultati Mann-Whitney Post-Hoc testov

SLO child funkcija	rs4880 <i>SOD2</i>		Post-Hoc (Mann-Whitney)		
	p	N	GG-AG	GG-AA	AA-AG
COG (K-W test)	0,001	251	0,584	0,008	< 0,001
RC (K-W test)	0,031	251	0,657	0,046	0,011

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; RC: razumevanja; K-W: Kruskal-Wallis



Slika 17: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti rezultatov med genotipi GG, AG, AA polimorfizma *SOD2* za BSID-III (LN vrednosti kognitivne (COG) funkcije) slovenskih otrok ter p vrednost testa Kruskal-Wallis (K-W) in Mann-Whitney (M-W) Post-Hoc test



Slika 18: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti rezultatov med genotipi GG, AG, AA polimorfizma *SOD2* za BSID-III (LN vrednosti funkcije razumevanja (RC)) slovenskih otrok ter p vrednost testa Kruskal-Wallis (K-W) in Mann-Whitney (M-W) Post-Hoc test

Glede na Mann-Whitney teste smo pokazali, da se rezultati BSID-III za COG funkcijo med seboj značilno razlikujejo med genotipoma GG-AA in AA-AG, pri čemer imajo otroci z genotipom AA značilno nižje rezultate testa za COG funkcijo. Med seboj se razlikujejo rezultati testa za funkcijo RC med genotipskima skupinama AA in AG. Genotipska skupina AA ima statistično značilno nižje rezultate testa za funkcijo RC. Rezultati so v skladu z našo začetno predpostavko, ki pravi, da je alel A polimorfizma rs4880 gena *SOD2* povezan s slabšimi ocenami trenutnega razvojnega stanja otroka. Povprečne vrednosti pri posameznem genotipu so prikazane v preglednici XXXVII v poglavju 7. Priloge.

Neskladnosti, ki so se pokazale pri analizi hrvaških in slovenskih otrok, lahko pripišemo različnim ocenjevalcem razvoja otrok ter različni obliki podanih rezultatov tj. imeli smo na voljo surove rezultate hrvaških otrok, medtem ko so bili rezultati slovenskih otrok pretvorjeni v standardne vrednosti.

4.3.2 Vključitev sočasnih spremenljivk pri ugotavljanju povezanosti genetskih polimorfizmov z nevrološkim razvojem otroka

Kjer smo pri rezultatih testa ANOVA dobili statistično značilne povezave ali mejno signifikantne vrednosti (točka 4.3.1.), smo v nadaljnjem testu ANCOVA upoštevali še dejstvo, da lahko na signifikantnost, ki jo pokažejo testi ANOVA, vplivajo različne sočasne spremenljivke. S testi ANCOVA izključimo vpliv sočasnih spremenljivk in preverimo, ali še vedno obstaja statistično značilna razlika med genotipskimi podskupinami.

Pogoj, da lahko neko spremenljivko vključimo v analizo kot sočasno spremenljivko je njena neodvisnost od eksperimentalnega efekta (genotip polimorfizma) in homogenost naklona regresijske premice.

Postavili smo ničelno hipotezo: povprečne vrednosti rezultatov BSID-III med genotipskimi podskupinami so enake, kar pomeni, da preučevani polimorfizem ni povezan z rezultati BSID-III za COG, LANG (RC, EC) in MOT (FM, GM) funkcijo otroka, če izključimo vpliv sočasnih spremenljivk.

a) Ocena povezanosti genetskih polimorfizmov ob upoštevanju sočasnih spremenljivk v skupini hrvaških (CRO) otrok

Rezultati BSID-III za hrvaške otroke niso bili pretvorjeni v standardne vrednosti (angl. *composite score*) oz. v rezultate v obliki lestvice (angl. *scaled score*), ki že upoštevajo otrokovo starost, zato smo pri analizi ANCOVA otrokovo starost upoštevali kot sočasno spremenljivko. V preglednici XIX so povzeti rezultati testa ANCOVA, kjer smo izključili vpliv starosti otroka. V vseh primerih je dana sočasna spremenljivka statistično značilno povezana z razvojno funkcijo otroka.

Preglednica XIX: Rezultati testov ANCOVA z vključitvijo sočasne spremenljivke, starost otroka, za vse tri polimorfizme pri hrvaških otrocih

POLIMORFIZEM FUNKCIJA	rs4998557 <i>SOD1</i> *	rs4880 <i>SOD2</i>	rs1049982 <i>CAT</i>
CRO otroci	p (N = 121)	p (N = 121)	p (N = 120)
COG (ANCOVA)	0,931	0,456	0,080
RC (ANCOVA)	0,601	0,293	0,809
EC (ANCOVA)	0,448	0,477	0,206
LANG (ANCOVA)	0,450	0,329	0,338
FM (ANCOVA)	0,090	0,877	0,919
MOT (ANCOVA)	0,248	0,951	0,382
COG*LANG*MOT ^Δ (ANCOVA)	0,750	0,440	0,098

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična; K-W: Kruskal-Wallis

^Δ pomnožene vrednosti COG, LANG in MOT funkcije otrok

* pri polimorfizmu rs4998557 (*SOD1*) ni bilo prisotne genotipske različice AA, zato smo namesto testa ANOVA uporabili t-test in namesto K-W testa Mann-Whitney test za primerjavo dveh neodvisnih skupin (GG in AG)

Iz preglednice XIX je razvidno, da je povezava polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) in funkcije FM otroka, po izključitvi vpliva starosti otroka, postala mejno signifikantna ($p = 0,090$). Efekt polimorfizma rs1049982 (*CAT*) na COG funkcijo in produkt COG*LANG*MOT funkcij pa se je zmanjšal (vrednost F se je zmanjšala iz 2,94 na 2,58 za COG funkcijo in iz 2,82 na 2,37 za produkt COG*LANG*MOT funkcij)

V preglednicah XX, XXI in XXII so povzeti rezultati testov ANCOVA pri hrvaških in slovenskih otrocih, kjer smo upoštevali še druge sočasne spremenljivke.

Preglednica XX: Rezultati testov ANCOVA za polimorfizem rs4998557 (*SOD1*) pri hrvaških otrocih

KOVARIATA/ KOMBINACIJE	FM		
	p_{ANCOVA}	η^2	N
rs4998557 (<i>SOD1</i>)			
/	0,347	$\eta^2_{\text{SOD1}} = 0,007$	121
STAROST OTROKA	0,090	$\eta^2_{\text{SOD1}} = 0,024;$ $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,233$	121
STAROST OTROKA*IncordHg	0,109	$\eta^2_{\text{SOD1}} = 0,025;$ $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,242;$ $\eta^2_{\text{IncordHg}} = 0,055$	105
STAROST OTROKA*SPOLO OTROKA	0,077	$\eta^2_{\text{SOD1}} = 0,026;$ $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,242;$ $\eta^2_{\text{SPOLO}} = 0,041$	121
STAROST OTROKA*SPOLO OTROKA*IncordHg	0,079	$\eta^2_{\text{SOD1}} = 0,030;$ $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,247;$ $\eta^2_{\text{SPOLO}} = 0,040;$ $\eta^2_{\text{IncordHg}} = 0,058,$	105

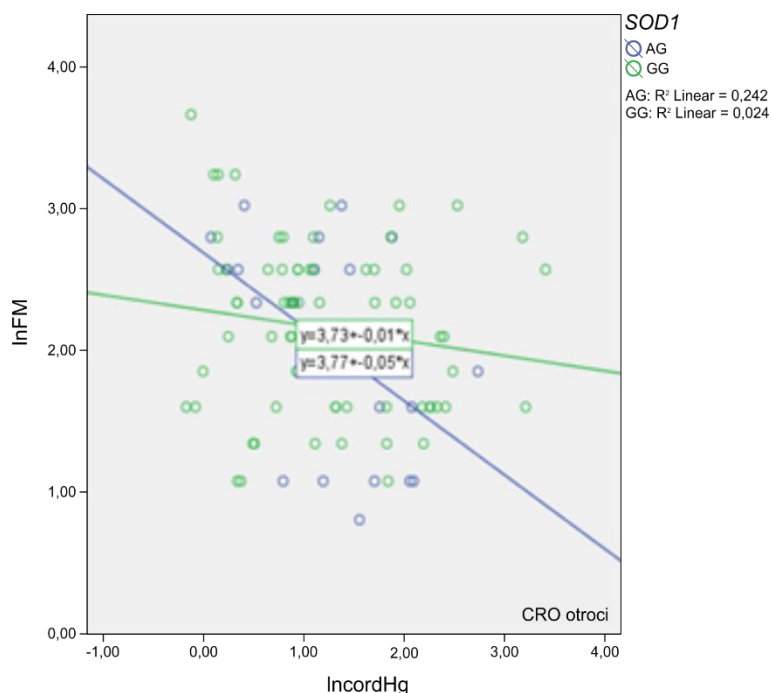
Pomen okrajšav v preglednici: FM: funkcija fine motorike;
cord: popkovnična kri; η^2 = velikost efekta;

N = število vzorcev, p_{ANCOVA} = eksperimentalna p vrednost testa ANCOVA

Sočasna spremenljivka oz. kovariata, starost otroka, je statistično značilno povezana s funkcijo FM ($p < 0,001$, delni $\eta^2 = 0,233$). Vrednost η^2 (x100) nam pove, v kolikšni meri (%) nam dana neodvisna spremenljivka oz. kovariata pojasni varianco v odvisni spremenljivki (v tem primeru funkciji FM otroka). Starost otroka nam pojasni približno 24 % variance funkcije FM, polimorfizem rs4998557 (*SOD1*) pa približno 2,5 %.

Sočasna spremenljivka, koncentracija Hg_{cel} v popkovnični krvi (cordHg), je statistično značilno povezana s funkcijo FM ($p = 0,017$). Koncentracija IncordHg nam pojasni približno 5,5 % variance funkcije FM. Ob upoštevanju sočasne spremenljivke, starost otroka, in koncentracije IncordHg se p vrednost poveča in ni več mejno signifikantna ($p = 0,109$). Na **sliki 19** je predstavljen graf odvisnosti funkcije FM hrvaških otrok od koncentracije Hg_{cel} v popkovnični krvi ter genotipa polimorfizma rs4998557 (*SOD1*).

Sočasna spremenljivka, spol otroka, ni statistično značilno povezana s funkcijo FM ($p = 0,145$). Spol otroka nam pojasni približno 4,0 % variance funkcije FM.



Slika 19: Odvisnost funkcije fine motorike (FM) hrvaških otrok od celokupne koncentracije Hg v popkovnični krvi (cordHg) ter genotipa polimorfizma rs4998557 (*SOD1*)

Iz grafa lahko opazimo trend negativne povezanosti koncentracije Hg_{cel} v popkovnični krvi ter funkcije FM hrvaških otrok. V primeru genotipa AG ima linearna regresijska premica višjo negativno vrednost koeficienta, kar nakazuje na večji vpliv genotipa AG na rezultate funkcije FM otroka v odvisnosti od izpostavljenosti Hg. Ljudje ob enaki izpostavljenosti višjim koncentracijam Hg_{cel} (na osnovi meritve v popkovnični krvi) bi morda lahko imeli slabšo oceno funkcije FM, če so nosilci AG v primerjavi z nosilci GG alelov. To pomeni, da bi genotip GG lahko predstavljal zaščitni marker za nevrološki status otroka. Vrednosti determinacijskega koeficienta (R^2) premic sta prenizki, da bi lahko naredili trdne zaključke.

Preglednica XXI: Rezultati testov ANCOVA za polimorfizem rs1049982 (*CAT*) pri hrvaških otrocih

FUNKCIJA KOVARIATA/ KOMBINACIJE	COG			COG*LANG*MOT ^Δ		
	p_{ANCOVA}	η^2	N	p_{ANCOVA}	η^2	N
rs1049982 (<i>CAT</i>)						
/	0,057	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,048$	120	0,064	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,046$	120
STAROST OTROKA	0,080	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,043$; $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,217$	120	0,098	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,039$; $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,178$	120
STAROST OTROKA*IncordHg	0,067	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,053$; $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,212$; $\eta^2_{\text{IncordHg}} = 0,003$	104	0,040	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,063$; $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,178$; $\eta^2_{\text{IncordHg}} = 0,0002$	104
STAROST OTROKA*SPOL OTROKA	0,082	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,043$; $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,217$; $\eta^2_{\text{SPOL}} = 0,00005$	120	0,099	$\eta^2_{\text{CAT}} = 0,039$; $\eta^2_{\text{STAROST}} = 0,183$; $\eta^2_{\text{SPOL}} = 0,028$	120

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna funkcija; cord: popkovnična kri; η^2 = velikost efekta; N = število vzorcev,

p_{ANCOVA} = eksperimentalna p vrednost testa ANCOVA

^Δ pomnožene vrednosti COG, LANG in MOT funkcije otrok (interakcije)

Sočasna spremenljivka, starost otroka, je statistično značilno povezana s COG funkcijo ($p < 0,001$, delni $\eta^2 = 0,217$) oz. produktom vrednosti COG*LANG*MOT funkcij ($p < 0,001$, delni $\eta^2 = 0,178$). Efekt polimorfizma rs1049982 (*CAT*) na COG funkcijo in produkt COG*LANG*MOT funkcij otroka je po izključitvi vpliva starosti otroka postal manjši.

Sočasni spremenljivki, koncentracija Hg_{cel} v popkovnični krvi (cordHg) in spol otroka, nista statistično značilno povezana s COG funkcijo oz. produktom vrednosti COG*LANG*MOT funkcij ($p > 0,05$). Vrednost p testa ANCOVA ostaja mejno signifikantna ($p = 0,067$ oz. $p = 0,082$)

Ob upoštevanju sočasne spremenljivke, starost otroka in koncentracija Hg_{cel} v popkovnični krvi, je povezava polimorfizma rs1049982 (*CAT*) in produkta COG*LANG*MOT funkcij otroka, postala statistično značilna ($p = 0,040$). Zaradi majhnega vzorca in majhne statistične moči testiranja (upoštevanje dveh sočasnih spremenljivk in produkta COG*LANG*MOT funkcij) se nam ta rezultat ni zdel relevanten.

b) Ocena povezanosti genetskih polimorfizmov ob upoštevanju sočasnih spremenljivk v skupini slovenskih (SLO) otrok

Preglednica XXII: Rezultati testov ANCOVA za polimorfizem rs4880 (*SOD2*) pri slovenskih otrocih

FUNKCIJA KOVARIATA	LANG			COG*LANG*MOT ^Δ		
	p_{ANCOVA}	η^2	N	p_{ANCOVA}	η^2	N
rs4880 (<i>SOD2</i>)						
/	0,074	$\eta^2_{\text{SOD2}} = 0,021$	251	0,013	$\eta^2_{\text{SOD2}} = 0,034$	251
lncordHg	0,072	$\eta^2_{\text{SOD2}} = 0,021$; $\eta^2_{\text{lncordHg}} = 0,00002$	246	0,016	$\eta^2_{\text{SOD2}} = 0,034$; $\eta^2_{\text{lncordHg}} = 0,004$	246
SPOL OTROKA	0,019	$\eta^2_{\text{SOD2}} = 0,032$; $\eta^2_{\text{SPOL}} = 0,102$	251	0,005	$\eta^2_{\text{SOD2}} = 0,043$; $\eta^2_{\text{SPOL}} = 0,050$	251

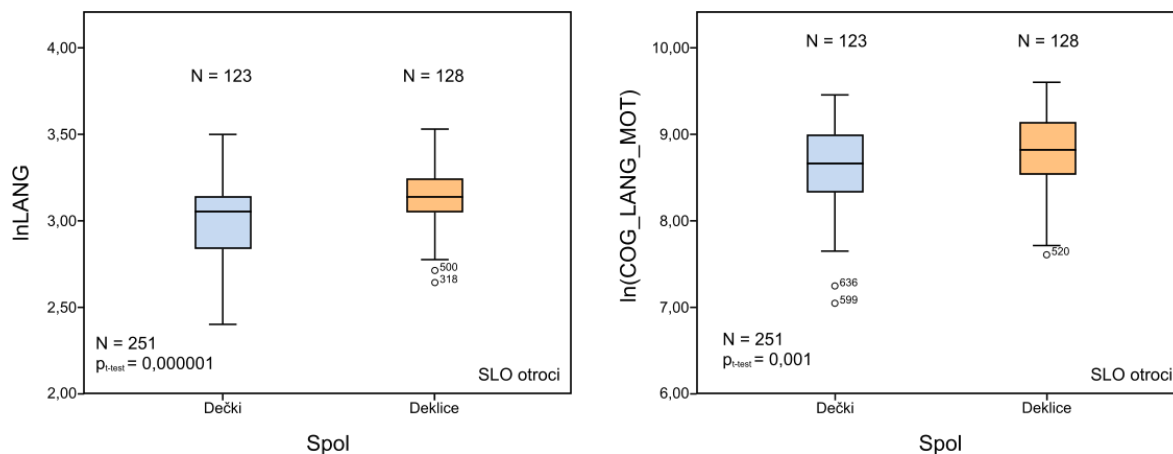
Pomen okrajšav v preglednici: LANG: jezikovna funkcija; cord: popkovnična kri; η^2 = velikost efekta; N = število vzorcev,

p_{ANCOVA} = eksperimentalna p vrednost testa ANCOVA

^Δ pomnožene vrednosti COG, LANG in MOT funkcije otrok (interakcije)

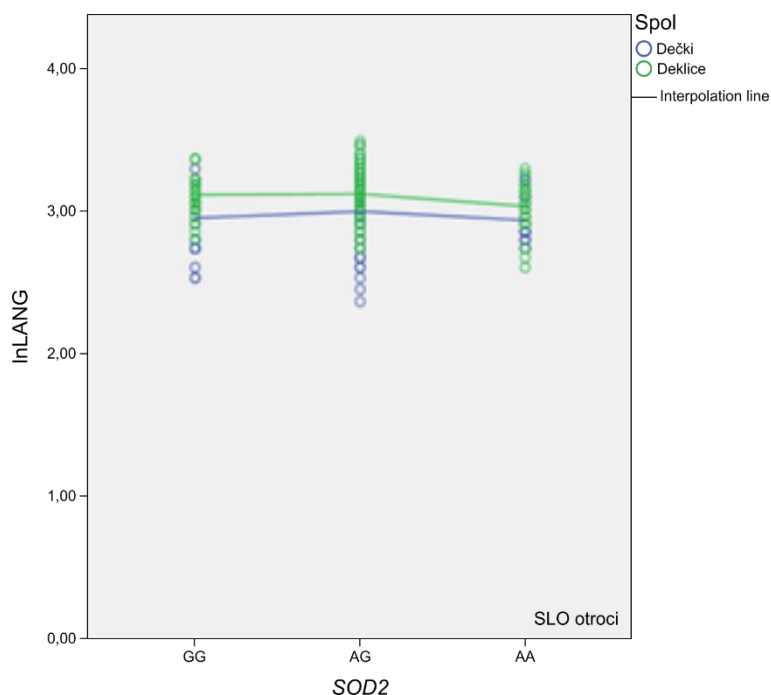
Sočasna spremenljivka, koncentracija Hg_{cel} v popkovnični krvi (cordHg), ni statistično značilno povezana z LANG funkcijo oz. produktom vrednosti COG*LANG*MOT funkcij ($p = 0,942$). Iz tega lahko zaključimo, da koncentracija Hg_{cel} v popkovnični krvi ni dober napovedni marker LANG funkcije oz. produkta COG*LANG*MOT funkcij otroka.

Sočasna spremenljivka, spol otroka, je statistično značilno povezana z LANG funkcijo ($p = 0,000001$, delni $\eta^2 = 0,102$), pri čemer imajo dečki statistično značilno nižjo srednjo vrednost ocene LANG funkcije (**sliki 20 in 21**). Efekt polimorfizma rs4880 (*SOD2*) na LANG funkcijo otroka je po izključitvi sočasne spremenljivke, spol otroka, postal statistično značilen ($p = 0,019$). Spol otroka je prav tako statistično značilno povezan s produktom vrednosti COG*LANG*MOT funkcij ($p = 0,001$, delni $\eta^2 = 0,050$) (**slika 20**). Vrednost p testa ANCOVA se v tem primeru zmanjša na vrednost 0,005. V teh dveh primerih lahko zavremo ničelno hipotezo.



Slika 20: Primerjava srednjih vrednosti in razpršenosti rezultatov BSID-III (LN vrednosti jezikovne funkcije (LANG) – levo in pomnoženih vrednosti COG*LANG*MOT funkcije - desno) med spoloma (0-dečki, 1-deklice) slovenskih otrok ter p vrednost neodvisnega t-testa

Iz grafa lahko vidimo, da imajo dečki statistično značilne nižje vrednosti ocene LANG funkcije in produkta COG*LANG*MOT funkcij.



Slika 21: Odvisnost jezikovne (LANG) funkcije slovenskih otrok od genotipa polimorfizma rs4880 (SOD2) ter spola (dečki, deklice)

Iz grafa lahko razberemo, da imajo dečki v povprečju nižje vrednosti ocene LANG funkcije ter da imajo nižje vrednosti LANG funkcije otroci z genotipom AA v zapisu encima SOD2. V primeru genotipa AA pričakujemo 30-40 % zmanjšano aktivnost encima SOD2 zaradi spremembe sekundarne strukture in s tem slabše učinkovitosti prenosa encima preko mitohondrijske membrane. Rezultat se ujema z našo začetno predpostavko glede vpliva

genotipa na razvojno funkcijo otroka. Ugotovili pa smo tudi, da dečki v povprečju dosegajo slabše rezultate LANG funkcije (v našem primeru testirano pri 18. mesecih starosti z BSID-III). Številne študije poročajo o vplivu testosterona na zapozneli razvoj LANG funkcije pri dečkih (62).

4.3.3 Ugotavljanje povezanosti kombinacije genotipov z nevrološkim razvojem otroka

S testi ANOVA smo za kombinacijo genotipov vseh treh polimorfizmov rs4998557 (73-1211G>A; *SOD1*), rs4880 (47A>G; *SOD2*) in rs1049982 (-20T>C; *CAT*) testirali povezanost tistih parametrov, ki se v skladu s Kolmogorov-Smirnov testom porazdeljujejo normalno. Neodvisna spremenljivka je bila v tem primeru kombinacija genotipov treh polimorfizmov, določenih pri vsakem novorojenčku. Rezultati v preglednicah XXIII in XXIV ne prikazujejo značilnih povezav med kombinacijo genotipov in fenotipom. Zaključimo lahko torej, da kombinacija genotipov polimorfizmov v genih *SOD1*, *SOD2* in *CAT* ne vpliva na nevrološki razvoj otrok s Hrvaške in iz Slovenije. Problematična je lahko interpretacija rezultatov, saj imamo majhno število vzorcev za tako grupirane analize in s tem majhno statistično moč testiranja.

Preglednica XXIII: Rezultati testov ANOVA za kombinacijo polimorfizmov rs4998557 (*SOD1*), rs4880 (*SOD2*) in rs1049982 (*CAT*) pri hrvaških otrocih

POLIMORFIZEM FUNKCIJA	rs4998557 (<i>SOD1</i>) rs4880 (<i>SOD2</i>) rs1049982 (<i>CAT</i>)
CRO otroci	p (N = 120)
COG	0,482
LANG	0,684
MOT	0,512
COG*LANG*MOT	0,526

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; LANG: jezikovna; MOT: motorična

Preglednica XXIV: Rezultati testov ANOVA za kombinacijo polimorfizmov rs4998557 (*SOD1*), rs4880 (*SOD2*) in rs1049982 (*CAT*) pri slovenskih otrocih

POLIMORFIZEM FUNKCIJA	rs4998557 (<i>SOD1</i>) rs4880 (<i>SOD2</i>) rs1049982 (<i>CAT</i>)
SLO otroci	p (N = 251)
LANG	0,378
COG*LANG*MOT	0,587

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; LANG: jezikovna; MOT: motorična

4.3.4 Ugotavljanje povezanosti genetskih polimorfizmov pri hrvaških materah z nevrološkim razvojem hrvaških otrok

Preverili smo še vpliv genotipa hrvaških mater na rezultate BSID-III za COG, LANG in MOT funkcijo ter rezultate produkta COG*LANG*MOT funkcij hrvaških otrok. Pri preučevanih polimorfizmih ni videti značilnih povezav, kar je razvidno iz preglednice XXV. Nobena p vrednost ni manjša od 0,05.

Preglednica XXV: Rezultati testov ANOVA za polimorfizme rs4998557 (*SOD1*), rs4880 (*SOD2*) in rs1049982 (*CAT*) pri hrvaških materah

POLIMORFIZEM FUNKCIJA	rs4998557 <i>SOD1</i> *	rs4880 <i>SOD2</i>	rs1049982 <i>CAT</i>
CRO otroci	p (N = 131)	p (N = 128)	p (N = 134)
COG (ANOVA)	0,378	0,502	0,926
LANG (ANOVA)	0,156	0,932	0,637
MOT (ANOVA)	0,408	0,152	0,409
COG*LANG*MOT ^Δ (ANOVA)	0,166	0,804	0,743

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; LANG: jezikovna; MOT: motorična

^Δ pomnožene vrednosti COG, LANG in MOT funkcije otrok (interakcije)

* pri polimorfizmu rs4998557 (*SOD1*) je bila frekvenca genotipa AA pri hrvaških materah zelo nizka (2,3 %) zato smo združili genotipski skupini AA in AG. Namesto testa ANOVA smo uporabili t-test in namesto K-W testa Mann-Whitney test za primerjavo dveh neodvisnih skupin (GG in AG+AA)

Po teh rezultatih lahko sklepamo, da genotip matere, za polimorfizme v genih *SOD1* (rs4998557), *SOD2* (rs4880) in *CAT* (rs1049982), ni napovedni marker razvojne funkcije otroka, saj ne obstaja povezanost med genotipom matere in oceno nevrološke razvitosti otroka.

4.3.5 Ugotavljanje povezanosti celokupne koncentracije Hg oz. koncentracije MeHg z nevrološkim razvojem otroka

Zanimalo nas je tudi, ali obstaja statistično značilna korelacija med celokupno koncentracijo Hg (Hg_{cel}) oz. koncentracijo MeHg v različnih bioloških vzorcih (lasje, venska kri, mleko matere, popkovnična kri, urin novorojenčka) ter rezultati ocene COG, LANG (RC, EC) in MOT (FM, GM) funkcije otroka.

Korelacija nam opiše moč linearne povezave med dvema spremenljivkama. Korelacijski koeficient (r) je merilo za velikost linearne povezave, obsega vrednosti od -1 do +1. Vrednost koeficienta +1 kaže na popolno pozitivno razmerje, vrednost -1 kaže na popolno negativno razmerje, vrednost 0 pomeni, da med spremenljivkama ni linearne povezave. V primeru normalne porazdelitve spremenljivk korelacijo med spremenljivkama določimo s pomočjo

Pearsonovega korelacijskega koeficienta. Ko spremenljivke niso normalno porazdeljene uporabimo Spearmanov ρ test oz. korelacijo rangov.

Postavili smo ničelno hipotezo: koncentracija Hg_{cel} oz. MeHg v vzorcih las, krvi, mleka matere, popkovnične krvi in urina novorojenčkov ni povezana z rezultati BSID-III za COG, LANG (RC, EC) in MOT (FM, GM) funkcijo otroka. Sklepali smo, da je povišana koncentracija Hg_{cel} oz. MeHg v različnih bioloških vzorcih povezana s slabšimi ocenami trenutnega razvojnega stanja otroka. Gre za usmerjeno hipotezo, zato smo uporabili enostranski test signifikantnosti.

V preglednicah XXVI in XXVII so predstavljeni rezultati testiranja korelacije za hrvaške in slovenske otroke. Vrednost p , ki je manjša od 0,05, dokazuje statistično značilno povezavo med omenjenima spremenljivkama in je označena krepko. V oklepajih so vrednosti Pearsonovega (r_p) oz. Spearmanovega (r_s) koeficienta.

Preglednica XXVI: Rezultati korelacije med koncentracijo Hg_{cel} oz. MeHg v različnih bioloških vzorcih ter nevrolško funkcijo hrvaških otrok ocenjeno z BSID-III

CRO otroci	COG (r_p)	RC (r_p)	EC (r_p)	LANG (r_p)	FM (r_p)	GM (r_s)	MOT (r_p)	COG* LANG* MOT (r_p)
InhairHg (N = 138)	0,076 (-,123)	0,374 (-,028)	0,412 (-,019)	0,382 (-,026)	0,007 (-,207)	0,101 (,109)	0,201 (-,072)	0,182 (-,078)
InhairMeHg (N = 34)	0,156 (,178)	0,443 (,026)	0,016 (-,369)	0,087 (-,238)	0,256 (,116)	0,453 (-,021)	0,269 (,110)	0,332 (-,078)
InmHg (N = 137)	0,226 (-,065)	0,373 (-,028)	0,217 (,067)	0,361 (,031)	0,012 (-,193)	0,106 (,107)	0,278 (-,051)	0,449 (-,011)
InmMeHg (N = 38)	0,311 (,082)	0,229 (-,124)	0,383 (-,050)	0,288 (-,093)	0,499 (,001)	0,498 (,001)	0,449 (,021)	0,421 (-,033)
IncordHg (N = 132)	0,067 (-,131)	0,254 (-,058)	0,168 (,084)	0,378 (,027)	0,001 (-,258)	0,113 (,106)	0,116 (-,105)	0,301 (-,046)
IncordMeHg (N = 35)	0,159 (,174)	0,299 (,092)	0,421 (-,035)	0,451 (,022)	0,264 (-,111)	0,278 (,103)	0,350 (,068)	0,340 (,072)
InmilkHg (N = 77)	0,118 (-,137)	0,295 (-,062)	0,464 (-,010)	0,415 (-,025)	0,007 (-,282)	0,145 (,122)	0,338 (-,049)	0,302 (-,060)
InbuHg[□] (N = 84)	0,048 (-,182)	0,153 (-,113)	0,450 (,014)	0,348 (-,043)	0,036 (-,197)	0,272 (-,067)	0,067 (-,164)	0,117 (-,131)

Navedene so eksperimentalne p vrednosti in vrednosti Pearsonovega oz. Spearmanovega koeficienta v oklepaju.

Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija; r_p : Pearsonov koeficient; r_s : Spearmanov koeficient; hair: lasje; m: venska kri; cord: popkovnična kri; milk: mleko; bu: urin novorojenčka

[□] spremenljivka InbuHg se ne porazdeljuje normalno zato smo v vseh primerih testiranja korelacije z BSID-III funkcijo uporabili Spearmanov test

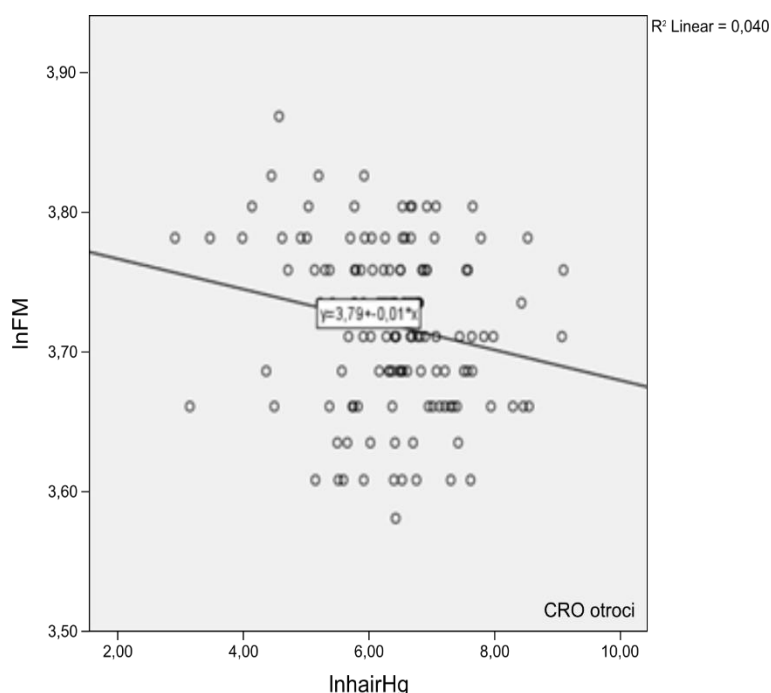
Opomba: p vrednosti niso popravljene za multiple teste/primerjave

Iz preglednice XXVI je razvidno, da pri hrvaški populaciji obstaja statistično značilna povezava:

1. koncentracije Hg_{cel} v lasih (**slika 22**), venski krvi, popkovnični krvi, mleku in urinu novorojenčka z ocenami funkcije FM
2. koncentracije Hg_{cel} v urinu novorojenčka z ocenami COG funkcije
3. koncentracije MeHg v lasih z ocenami funkcije EC.

V teh primerih lahko zavržemo ničelno hipotezo. Pri vseh zgoraj omenjenih značilnih povezavah zasledimo negativno korelacijo med koncentracijo Hg_{cel} in funkcijo FM hrvaških otrok.

O povezavi med motorično funkcijo in koncentracijo Hg_{cel} so poročali tudi v študiji iz Brazilije (leta 2003) (63), v študiji s Poljske (leta 2006) (64) in v študiji iz ZDA (leta 2008) (65). V multicentrični kohortni študiji v Španiji (vključene 4 regije: Katalonija, Baskija, Asturija, Valencija) so ocenjevali povezavo med celokupno koncentracijo Hg v popkovnični krvi in negativnim vplivom na duševni in psihomotorični razvoj otroka. Pri analizi se ni izkazalo, da bi celokupna koncentracija Hg vplivala na duševni in psihomotorični razvoj otrok obeh spolov. Izkazalo pa se je, da ima prenatalna celokupna koncentracija Hg vpliv na psihomotorični razvoj otrok ženskega spola. Na rezultate lahko vplivajo notranji dejavniki kot so genetika, hormoni, hranilne snovi, itd. zato bi bile potrebne dodatne študije v tej smeri (49).



Slika 22: Odvisnost funkcije fine motorike (FM) hrvaških otrok od celokupne koncentracije Hg v lasih matere (hairHg)

Iz grafa je razvidna negativna korelacija koncentracije Hg_{cel} v lasih matere ter funkcije FM otroka. Povezava med funkcijo FM in koncentracijo Hg_{cel} v lasih matere je značilna. Že iz vzorca las matere je mogoče videti vpliv koncentracije Hg_{cel} na oceno funkcije FM hrvaških otrok (**slika 22**), kar bi lahko v prihodnosti izkoristili kot presejalni test za spremljanje izpostavljenosti Hg tekom nosečnosti in preprečevanje morebitnih razvojnih nepravilnosti motoričnih funkcij otroka.

Potrebno bi bilo še dodatno testirati povezanost razvojnih funkcij otroka s koncentracijami MeHg, saj smo imeli v raziskavi premajhno število podatkov ($n < 40$) in s tem premajhno statistično moč testiranja, da bi lahko naredili trdne zaključke.

Preglednica XXVII: Rezultati korelacije med koncentracijo Hg_{cel} oz. MeHg v različnih bioloških vzorcih ter nevrolško funkcijo slovenskih otrok ocenjeno z BSID-III

SLO otroci	COG (r_s)	RC (r_s)	EC (r_s)	LANG (r_p)	FM (r_s)	GM (r_s)	MOT (r_s)	COG* LANG* MOT (r_p)
InhairHg (N = 238)	0,374 (,021)	0,081 (,106)	0,487 (-,002)	0,173 (,061)	0,071 (-,095)	0,163 (-,064)	0,093 (-,086)	0,427 (,012)
InhairMeHg (N = 6)	0,100 (,609)	0,413 (-,116)	0,111 (,586)	0,149 (,513)	0,343 (-,213)	0,152 (-,507)	0,369 (-,177)	0,152 (0,508)
IncordHg (N = 246)	0,288 (-,036)	0,492 (,001)	0,367 (-,022)	0,494 (-,001)	0,007 (-,155)	0,056 (-,102)	0,015 (-,138)	0,180 (-,058)
IncordMeHg (N = 9)	0,192 (-,331)	0,213 (-,305)	0,429 (,070)	0,379 (-,120)	0,046 (-,595)	0,019 (-,694)	0,013 (-,726)	0,073 (-,526)
InmilkHg (N = 187)	0,211 (-,059)	0,434 (,012)	0,185 (-,066)	0,360 (,026)	0,007 (-,181)	0,303 (-,038)	0,032 (-,136)	0,389 (-,021)

Navedene so eksperimentalne p vrednosti in vrednosti Pearsonovega oz. Spearmanovega koeficienta v oklepaju.

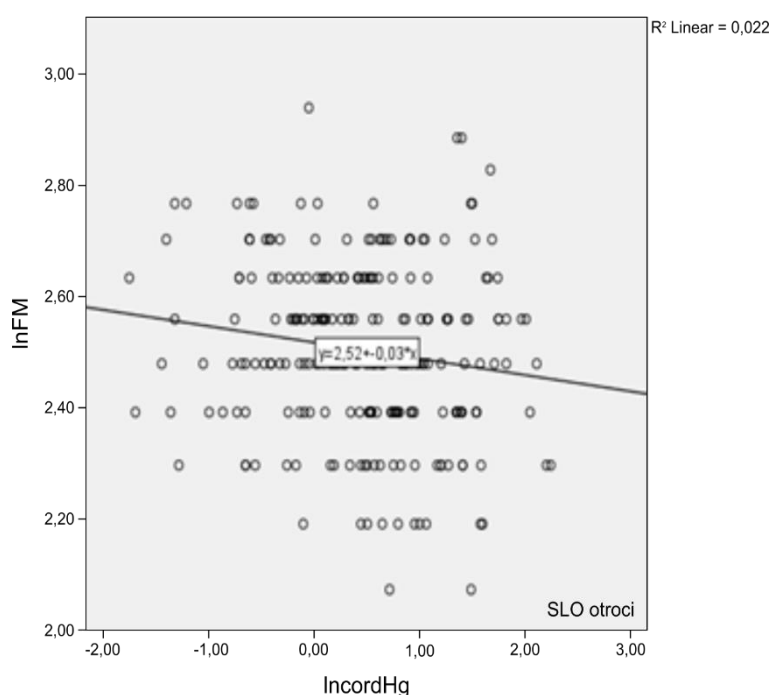
Pomen okrajšav v preglednici: COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija; r_p : Pearsonov koeficient; r_s : Spearmanov koeficient; hair: lasje; cord: popkovnična kri; milk: mleko
Opomba: p vrednosti niso popravljene za multiple teste/primerjave

Iz preglednice XXVII je razvidno, da pri slovenski populaciji obstaja statistično značilna povezava:

1. koncentracije Hg_{cel} v popkovnični krvi (**slika 23**), mleku in koncentracije MeHg v popkovnični krvi z ocenami funkcije FM
2. koncentracije MeHg v popkovnični krvi z ocenami funkcije GM
3. koncentracije Hg_{cel} v popkovnični krvi, mleku in koncentracije MeHg v popkovnični krvi z ocenami MOT funkcij.

V teh primerih lahko zavržemo ničelno hipotezo. Pri vseh zgoraj omenjenih značilnih povezavah zasledimo negativno korelacijo med koncentracijo Hg_{cel} oz. MeHg v popkovnični krvi (cordHg oz. cordMeHg) ter funkcijo FM in GM ter MOT funkcijo otroka. Značilno

povezavo med koncentracijo Hg_{cel} v popkovnični krvi in funkcijo FM smo zaznali tako v primeru hrvaških kot slovenskih otrok, medtem ko smo statistično značilno povezavo med koncentracijo Hg_{cel} v laseh in funkcijo FM zaznali le pri hrvaških vzorcih. Na tem mestu se nam zastavi vprašanje, ali lahko koncentracijo Hg_{cel} v laseh vzamemo kot presejalni test, glede na to, da pri slovenski populaciji nismo zaznali statistično značilne povezave. V smislu uporabnosti in enostavnosti testiranja je želja, da se določevanje koncentracije Hg_{cel} izvede na laseh, saj je popkovno tkivo zelo delikaten biološki material. V našem primeru smo prišli do zaključka, da ima koncentracija Hg_{cel} v vzorcu popkovnične krvi boljšo napovedno vrednost.



Slika 23: Odvisnost funkcije fine motorike (FM) slovenskih otrok od celokupne koncentracije Hg v popkovnični krvi (cordHg)

Iz grafa je razvidna negativna korelacija koncentracije Hg_{cel} v popkovnični krvi ter funkcije FM otroka, kar pomeni, da pri višji izpostavljenosti Hg pričakujemo slabše rezultate funkcije FM otroka. Ta pojav lahko povežemo z dejstvom, da Hg vpliva na razvoj malih možganov, ki usklajujejo gibanje skeletnega mišičja (66, 67). S tem smo potrdili našo začetno predpostavko.

Zaradi premajhnega števila podatkov za koncentracijo MeHg v popkovnični krvi ($n = 9$) in s tem premajhne statistične moči testiranja ne moremo narediti trdnih zaključkov. Potrebni bi bili dodatni testi na večjem številu vzorcev. Vpliv prenatalne izpostavitve MeHg na

možgansko funkcijo se lahko pojavi v kasnejšem obdobju razvoja otroka. Rezultati študije, ki je potekala na Ferskih otokih, kažejo povezavo med izpostavitvijo MeHg pred rojstvom ter razvojem motoričnih funkcij, zbranostjo in jezikovnim znanjem 14-letnih otrok (68).

5 SKLEPI

Raziskovalno delo diplomske naloge smo zaključili z naslednjimi ugotovitvami:

- Nismo ugotovili, da so nosilci alela A polimorfizma rs4998557 v genu *SOD1* povezani s slabšimi ocenami nevrološkega razvoja. Slovenski otroci z genotipom GG so imeli statistično značilno nižje vrednosti ocene fine motorike ($p = 0,040$) in motorične funkcije ($p = 0,041$) v primerjavi z genotipom AG. Na funkcijo fine motorike vpliva tudi celokupna koncentracija Hg v popkovnični krvi ($p = 0,001$, testirano pri hrvaški populaciji; $p = 0,007$, testirano pri slovenski populaciji).
- Ugotovili smo, da so nosilci alela A polimorfizma rs4880 v genu *SOD2* povezani s slabšimi ocenami razvoja nekaterih nevroloških funkcij. Slovenski otroci z genotipom AA so imeli statistično značilno nižje vrednosti ocene kognitivne funkcije ($p = 0,001$), funkcije razumevanja ($p = 0,031$), produkta kognitivne, jezikovne in motorične funkcije ($p = 0,013$) ter jezikovne funkcije otroka ($p = 0,074$; mejno signifikatna vrednost) v primerjavi z genotipom AG oz. genotipom AG in GG v primeru kognitivne funkcije. Na jezikovno funkcijo in produkt kognitivne, jezikovne in motorične funkcije je vplival tudi spol otroka. Po izključitvi vpliva spola otroka je postal vpliv polimorfizma rs4880 na jezikovno funkcijo otroka statistično značilen ($p = 0,019$). Dečki so imeli statistično značilno nižje rezultate jezikovne funkcije ($p = 0,000001$) in rezultate produkta kognitivne, jezikovne in motorične funkcije ($p = 0,001$).
- Nismo ugotovili, da so nosilci alela C polimorfizma rs1049982 v genu *CAT* povezani s slabšimi ocenami nevrološkega razvoja.

Glede na hrvaške in slovenske vzorce, lahko povzamemo tudi, da celokupna koncentracija Hg (vključuje MeHg, Hg^{2+} in Hg^0) izmerjena v popkovnični krvi ($p_{CRO} = 0,001$; $p_{SLO} = 0,007$) in mleku doječih mater ($p_{CRO} = 0,007$; $p_{SLO} = 0,007$) statistično značilno vpliva na oceno fine motorike pri otrocih. V našem primeru smo prišli do zaključka, da ima koncentracija Hg_{cel} v vzorcu popkovnične krvi najboljšo napovedno vrednost vpliva na razvojne funkcije otroka. Premajhno število meritev koncentracije MeHg nam onemogoča trdne zaključke za ta parameter.

Nekatere neskladnosti, ki so se pokazale pri analizi hrvaških in slovenskih otrok, lahko pripišemo različnim ocenjevalcem razvoja otrok ter različni obliki podanih rezultatov tj. rezultati hrvaških otrok niso bili pretvorjeni v standardne vrednosti.

Za nadaljnje analize predlagamo večje število podatkov o koncentracijah MeHg v bioloških vzorcih mater in novorojenčkov, saj velja MeHg za najnevarnejšo obliko Hg, ki vpliva na nevrološki razvoj otroka. Predlagamo tudi nadaljnje spremljanje vpliva Hg oz. MeHg na razvoj otrok.

Zanimivo bi bilo preučiti ali obstaja povezava med genotipom preučevanih polimorfizmov antioksidantnih encimov in encimsko aktivnostjo v serumu. V naš model bi bilo v nadaljnje smiselno vključiti tudi polimorfizme antioksidantov (GSH) in antioksidantnih encimov (glutation peroksidaza, tioredoksin), ki so vpleteni v zaščito celic preko vezave Hg na $-SH$ oz. $-SeH$ skupine.

6 VIRI

1. Kliegman RM. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19th ed. 2011: Elsevier Health Sciences Division. 26-31.
2. Petrovič D. Embriologija živčevja. *Medicinski razgledi* 2000; 39: 381-388.
3. Petrovič D. Normalen razvoj človeškega zarodka in nepravilnosti v njegovem razvoju. *Medicinski razgledi* 2003; 42: 183-201.
4. Grandjean P and Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006; 368(9553): 2167-2178.
5. Berlin M, Zalups RK, and BA F. *Handbook on the toxicology of metals*. 3rd ed. 2008: Elsevier Inc. 675-729.
6. Klaassen C. *Casarett's & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poison*. 2008, McGraw-Hill Companies, Inc. 947-950.
7. Morel FMM, Kraepiel AML, and Amyot M. The Chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1998; 29(1): 543-566.
8. Gnamuš A. Živo srebro v kopenski prehranski verigi – Indikatorski organizmi, privzem in kopičenje. 2002: 266.
9. Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, et al. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res* 2003; 5(4): 283-305.
10. Ceccatelli S, Dare E, and Moors M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010; 188(2): 301-308.
11. Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 2002; 110 Suppl 1: 11-23.
12. Clarkson TW, Magos L, and Myers GJ. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *New England Journal of Medicine* 2003; 349(18): 1731-1737.
13. Counter SA and Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198(2): 209-230.
14. Farina M, Rocha JB, and Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci* 2011; 89(15-16): 555-563.
15. Aschner M, Syversen T, Souza DO, et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(3): 285-291.
16. Featherstone D. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. *Acs Chemical Neuroscience* 2010; 1: 4-12.
17. Hardingham GE and Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 2003; 26(2): 81-89.
18. Miao L and St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4): 344-356.
19. Hogberg HT, Kinsner-Ovaskainen A, Coecke S, et al. mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach. *Toxicol Sci* 2010; 113(1): 95-115.
20. Padhi BK, Pelletier G, Williams A, et al. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicol Lett* 2008; 176(2): 93-103.
21. Shimada M, Kameo S, Sugawara N, et al. Gene expression profiles in the brain of the neonate mouse perinatally exposed to methylmercury and/or polychlorinated biphenyls. *Arch Toxicol* 2010; 84(4): 271-286.

22. Wang L, Jiang H, Yin Z, et al. Methylmercury toxicity and Nrf2-dependent detoxification in astrocytes. *Toxicol Sci* 2009; 107(1): 135-143.
23. Miura K, Kobayashi Y, Toyoda H, et al. Methylmercury-induced microtubule depolymerization leads to inhibition of tubulin synthesis. *J Toxicol Sci* 1998; 23(5): 379-388.
24. Sugiura Y, Tamai Y, and Tanaka H. Selenium protection against mercury toxicity: high binding affinity of methylmercury by selenium-containing ligands in comparison with sulfur-containing ligands. *Bioinorg Chem* 1978; 9(2): 167-180.
25. Rejc B, Osredkar J, and Geršak K. Oksidacijski stres in nosečnost. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 153-161.
26. Mottet NK, Shaw CM, and Burbacher TM. Health risks from increases in methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 1985; 63: 133-140.
27. Semczuk M and Semczuk-Sikora A. New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy. *Med Sci Monit* 2001; 7(2): 332-340.
28. Boskovic M, Vovk T, Saje M, et al. Association of SOD2, GPX1, CAT, and TNF genetic polymorphisms with oxidative stress, neurochemistry, psychopathology, and extrapyramidal symptoms in schizophrenia. *Neurochem Res* 2013; 38(2): 433-442.
29. Osredkar O. Oksidativni stres. *Zdravstveni vestnik* 2011; 81: 393-406.
30. Mravljak J. Radikali, verižne radikalske reakcije, ROS, RNS, RSS in oksidativni stres, Antioksidanti - Predavanja FK3. Dostop: 10.08.2013.
31. Perdih A and Pečar S. Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *Farmacevtski vestnik* 2006; 57: 24-29.
32. Ji L and Leichtweis S. Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *AGE* 1997; 20(2): 91-106.
33. Zelko IN, Mariani TJ, and Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(3): 337-349.
34. Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46(2): 77-83.
35. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362(6415): 59-62.
36. Yi JF, Li YM, Liu T, et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16(37): 4738-4746.
37. Udler M, Maia AT, Cebrian A, et al. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(21): 3015-3023.
38. Li XD, Chen JX, Liu YM, et al. Association between SNPs in SOD1 and noise-induced hearing loss in Chinese Han population. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2011; 29(12): 921-924.
39. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 2012; 501(2): 89-103.
40. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13(3): 145-157.
41. Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2335-2340.

42. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2008; 112(5): 1037-1042.
43. Möllsten A, Marklund SL, Wessman M, et al. A Functional Polymorphism in the Manganese Superoxide Dismutase Gene and Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2007; 56(1): 265-269.
44. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep* 2011; 16(6): 230-236.
45. Galecki P, Szemraj J, Zboralski K, et al. Relation between functional polymorphism of catalase gene (-262C>T) and recurrent depressive disorder. *Neuro Endocrinol Lett* 2009; 30(3): 357-362.
46. Oh B, Kim SY, Kim DJ, et al. Associations of catalase gene polymorphisms with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women. *J Med Genet* 2007; 44(1): e62.
47. Miklavčič A, Stibilj V, Heath E, et al. Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chemistry* 2011; 124(3): 711-720.
48. Inštitut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju - <http://sl.coot.si/oprema/institut-jozef-stefan/>. Dostop: 20.11.2013.
49. Llop S, Guxens M, Murcia M, et al. Prenatal exposure to mercury and infant neurodevelopment in a multicenter cohort in Spain: study of potential modifiers. *Am J Epidemiol* 2012; 175(5): 451-465.
50. Protokol DNA purification from tissues iz priročnika QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. 3rd ed. 2010. 33-36.
51. Štrukelj B and Kos J. Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. 2007, Ljubljana: Slovensko Farmacevtsko Društvo. 56-58.
52. Applied Biosystem, Genome database - http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResults?searchMode=keyword&CID=&productTypeSelect=genotyping&alternateTargetTypeSelect=&targetTypeSelect=snp_all&species=ltechall&otherSpecies=&keyword=rs4998557&batchUpload=#. Dostop: 10.5.2013.
53. Applied Biosystem, Genome database - http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResults?searchMode=keyword&CID=&productTypeSelect=genotyping&alternateTargetTypeSelect=&targetTypeSelect=snp_all&species=ltechall&otherSpecies=&keyword=rs4880&batchUpload=. Dostop: 10.5.2013.
54. Applied Biosystem, Genome database - http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/searchResults?searchMode=keyword&CID=&productTypeSelect=genotyping&alternateTargetTypeSelect=&targetTypeSelect=snp_all&species=ltechall&otherSpecies=&keyword=rs1049982&batchUpload=. Dostop: 10.5.2013.
55. Lestvice zgodnjega razvoja N. Bayley, Kavčič T., Zupančič M. - <http://www.centerpds.si/katalog/razvojni-preizkusi/lestvica-zgodnjega-razvoja-nancy-bayley-2-izdaja-bsid-ii>. Dostop: 10.08.2013.
56. Weiss L, Oakland T, and Aylward P. Bayley-III Clinical Use and Interpretation. 2010: Elsevier's Science & Technology.
57. Kolobe T. Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition (Bayley-III). 2010.
58. Field A. Discovering Statistics using SPSS. 3rd ed. 2009: SAGE Publications.
59. Tracey M. Genetic Equilibrium, *Encyclopedia of Genetics*. 2001: Academic Press, Elsevier. 834-835.

60. OEGE (Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies) - <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>. Dostop: 20.7.2013.
61. GraphPad Software - <http://graphpad.com/quickcalcs/chisquared1/>. Dostop: 20.7.2013.
62. Web MD - <http://www.webmd.com/parenting/baby/news/20120125/testosterone-may-delay-boys-speech-development>. Dostop: 1.12.2013.
63. Yokoo E, Valente J, Grattan L, et al. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 2003; 2(1): 8.
64. Jedrychowski W, Jankowski J, Flak E, et al. Effects of prenatal exposure to mercury on cognitive and psychomotor function in one-year-old infants: epidemiologic cohort study in Poland. *Ann Epidemiol* 2006; 16(6): 439-447.
65. Lederman S, Jones R, Caldwell K, et al. Relation between Cord Blood Mercury Levels and Early Child Development in a World Trade Center Cohort. *Environ Health Perspect* 2008; 116(8): 1085–1091.
66. Scoville SA and Lane OP. Cerebellar abnormalities typical of methylmercury poisoning in a fledged saltmarsh sparrow, *Ammodramus caudacutus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2013; 90(5): 616-620.
67. Slovenski Medicinski e-Slovar. Elektronska verzija v1.0 ed: Lek in Medicinska Univerza v Ljubljani.
68. Debes F, Budtz-Jorgensen E, Weihe P, et al. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28(5): 536-547.

7 PRILOGE

Preglednica XXVIII: Rezultati genotipizacije pri nosečnicah in novorojenčkih s Hrvaške.

Siva polja: ni vzorca

št. vzorca	rs4998557 (SOD1) CRO matere	rs4998557 (SOD1) CRO otroci	rs4880 (SOD2) CRO matere	rs4880 (SOD2) CRO otroci	rs1049982 (CAT) CRO matere	rs1049982 (CAT) CRO otroci
100001		GG		AG		CT
100003		GG		GG		CC
100004		GG		AA		TT
100005		GG		AA		CC
100006		AG		AG		CC
100008		GG		AA		CT
100009		GG		AG		CC
100010		GG		GG		CC
100012		AG	AG	GG	CC	CC
100013	GG	GG	AG	GG	CT	CT
100015	GG	GG	AG	AG	CT	CC
100016	GG	GG	AG	GG	CT	CT
100017	GG		AG		CC	
100018	GG	AG	AG	AG	CC	CT
100020	GG	GG	AG	GG	CT	CC
100021			AG		CC	
100022		AG	AG	AA	CC	CC
100023	GG	GG	AA	AG	CT	CT
100024	GG	GG	AA	AG	CT	CT
100025	AG	AG	AG	AG	CC	CC
100026	GG	GG	AG	AA	CT	CC
100027	GG	GG	GG	GG	CC	CT
100028	GG		GG		CT	
100029	GG	GG	AA	AG	CT	TT
100030	GG	GG	AG	AA	CT	CC
100031	GG	GG	GG	GG	TT	TT
100032	GG	GG	GG	AG	CC	CT
100033	GG	AG	AA	AG	CT	CT
100035	GG	GG	AG	GG	TT	CC
100036	GG	GG	AA	AA	CT	TT
100037	GG	GG	AA	AG	CT	CT
100038	GG	GG	AG	GG	CT	CT
100039	AG	AG	AG	AG	CC	CC
100040	AG	AG	GG	GG	CT	TT
100041	GG	GG	AG	GG	CT	CT
100042	GG	GG	GG	GG	CT	CT

št. vzorca	rs4998557 (SOD1) CRO matere	rs4998557 (SOD1) CRO otroci	rs4880 (SOD2) CRO matere	rs4880 (SOD2) CRO otroci	rs1049982 (CAT) CRO matere	rs1049982 (CAT) CRO otroci
100043	GG	GG	GG	AG	CC	CT
100044	GG		AG		CC	
100045	GG	GG	GG	AG	CC	CT
100046	GG	GG	GG	GG	CC	CC
100047	GG	GG	GG	AG	CT	CT
100049		AG		GG		CC
100050	AG	GG	AA	AA	CC	CC
100051	GG	GG	GG	GG	CC	CC
100052	AG	GG	AA	AG	CT	CT
100053	GG		AA		CC	
100054	GG	GG	GG	AG	CT	CT
100055	GG	GG	GG	AG	CT	CT
100056	GG	GG	AG	AG		CC
100057	GG		AG		CT	
100058	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100059		AG		AA		CC
100060	AG	AG	AA	AG	CT	CT
100061		GG		AG		CC
100062	AG	AG	GG	AG	CT	CC
100063	GG	GG	AA	AG		CT
100064	GG	GG	AA	AG		TT
100065	GG	GG	AG	GG	CC	CT
100066	AG	AA	GG	GG	TT	CT
100067	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100068	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100069	AA	AG	AA	AG	CC	CT
100070	GG	AG	AA	AA	CC	CT
100071	GG	GG	AG	AA	CT	CT
100072	GG	GG	AA	AG	CT	CT
100073	GG	GG	AA	AG	CT	CC
100074	GG	GG	AA	AA	CC	CC
100075	AG	AG	GG	AG	TT	CT
100076	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100077	AG	AG	GG	GG	CT	CT
100078	GG	GG	AG	GG	CC	CT
100079	AG	AG	GG	GG	CC	CC
100080	GG	GG	AG	AG	TT	TT
100081	GG	GG	AG	AA	CC	CT
100082	GG	GG	AG	AA	TT	CT
100083	AG	GG	AG	AA	CC	CT
100084	GG	GG	AG	AG		

št. vzorca	rs4998557 (SOD1) CRO matere	rs4998557 (SOD1) CRO otroci	rs4880 (SOD2) CRO matere	rs4880 (SOD2) CRO otroci	rs1049982 (CAT) CRO matere	rs1049982 (CAT) CRO otroci
100085	AG	GG	AG	AG	CC	CT
100086			AG		CT	
100087	GG	GG	AA	AA	CC	CC
100088	GG	GG	AG	AG	CT	CT
100089	GG	GG	GG	AG	CC	CT
100090	GG	GG	AG	AA	CC	CC
100091		GG		AG	CT	TT
100092		AG	AG	AG	CC	CC
100093	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100094	AG	AG		AA	CC	CC
100095		GG	AA	AG	CC	CC
100096	GG	GG	GG	AG	CC	CC
100097	AG	GG	AG	AG	CC	CC
100098	GG	GG	GG	AG	CT	CC
100099	GG	GG	GG	AG	TT	CT
100100	AG	AG	AG	AA	CT	CC
100101	AG	AG	GG	GG	CC	CC
100102	GG		AG		CT	
100103	GG	GG		AG	CT	CC
100104	GG	GG		GG	CC	CC
100105		GG		GG	CC	CC
100106	GG				CC	
100107	GG				CT	
100108	GG					
100109	GG	GG		GG	CT	CC
100110	GG	GG		AG	CT	CT
100111	GG				CC	
100112		GG		AA		CT
100113	AG	AG		AG	CC	CC
100114	GG				CC	
100115	AG				CC	
100116	AG	GG	AG	AA	CT	CT
100117	GG	GG	GG	GG	CT	CC
100118	GG	GG	AG	AG	TT	CT
100119		GG	GG	AG	CT	CT
100120	GG	GG	GG	GG	CT	CC
100121	AG	AG	AG	AA	CT	TT
100122	AG	AG	AG	AA	CT	CT
100123	GG		AG		CT	
100124	GG	GG	AA	AG	CC	CC
100125	AG	GG	AG	AG	CT	CT

št. vzorca	rs4998557 (SOD1) CRO matere	rs4998557 (SOD1) CRO otroci	rs4880 (SOD2) CRO matere	rs4880 (SOD2) CRO otroci	rs1049982 (CAT) CRO matere	rs1049982 (CAT) CRO otroci
100126	AG	GG	AG	GG	CC	CC
100127	GG	GG	GG	GG	TT	CT
100128	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100129	AG		AA		CC	
100130	GG	GG	AA	AG	CT	CC
100131	AG	AG	GG	GG	CC	CC
100132	AG	GG	AG	AA	CT	TT
100133	GG	GG	AG	AA	CC	CC
100134	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100135	GG	GG	AG	GG	TT	TT
100136	AA	AG	AA	AA	TT	CT
100137	AG	AG	AG	GG	CT	CT
100138	GG	GG	AG	AA	CT	CC
100139	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100140	GG	AG	AG	AG	CT	CC
100141	GG	GG	GG	AG	CT	CT
100142	GG	GG	GG	GG	CC	CC
100143	GG	GG	AG	AG		CC
100144	GG		AG		CC	
100145	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100146	GG	GG	AA	AG	CT	CT
100147	GG	GG	GG	AG	CC	CC
100148	GG	GG	AA	AG	CT	TT
100149	GG	GG	GG	GG	TT	TT
100150	GG	AG	GG	AG	CC	CC
100151	GG	GG	GG	GG	CC	CC
100152	GG	GG	GG	GG	CC	CT
100153	GG	GG	AA	AG	TT	CT
100154	GG	GG	AG	GG	CC	CC
100155	AA		AA		CC	
100156	GG	GG	AG	GG	CT	CT
100157	GG	GG	GG	AG	CT	CT
100158	GG	GG	AG	GG	CC	CC
100159	GG	GG	AG	AA	CC	CC
100160	GG	GG	AG	AG	CT	CT
100161	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100162	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100163	GG		AG		CT	
100164	GG		GG		CC	
100165	GG	GG	AG	AG	CC	CT
100166	GG	GG	AG	AG	TT	TT

št. vzorca	rs4998557 (SOD1) CRO matere	rs4998557 (SOD1) CRO otroci	rs4880 (SOD2) CRO matere	rs4880 (SOD2) CRO otroci	rs1049982 (CAT) CRO matere	rs1049982 (CAT) CRO otroci
100167	GG	AG	AG	GG	CT	CT
100168	GG	GG	GG	AG	TT	CT
100169	GG	GG	AA	AA	CT	CT
100170	GG	GG	AG	AA	CT	CC
100171	GG	GG	AA	AA	TT	TT
100172	GG		GG		CC	
100173	AG	AA	AA	AG	CT	CC
100174	GG		AA		CC	
100175	GG		AA		CT	
100176	GG	AG	AG	AA	CT	CC
100177	GG		GG		CT	
100178	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100179	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100181	GG	AG	AG	AA	CC	CT
100182	GG	AG	AG	AG	CC	CC
100183	GG	GG	AG	AG	TT	CT
100184	GG		GG			
100185	GG	GG	AA	AG	CT	CC
100186	GG		AG			
100187	GG	GG	GG	AG	CC	CC
100188		GG		AG		CC
100190	AG	AG	AG	GG	CT	CT
100191	AG	GG	AG	GG	TT	CT
100192	GG	GG	GG	GG	CT	TT
100193	GG	GG	AG	AA	CC	CT
100194	GG	AG	AG	AG	CC	CT
100195	GG	GG	AG	AG	TT	CT
100196	GG	AG	GG	GG	CT	CC
100197	GG	GG	AG	AG	CC	CC
100198	GG		AA		CC	
100199	GG	GG	AG	AG	CT	CC
100200	GG	AG	AG	AA	CT	CT
100201	GG	GG	AG	GG	CC	CC
100202	AG	AG		AA	CC	CC
100203	AG		GG		CT	
100205		GG	AG	GG	CT	CT
100206	GG	GG	AG	AG	TT	CT
100207	GG		AG		CT	
100208	GG		GG		TT	
100209	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100210	AG	AG	AG	AG	CT	CT

št. vzorca	rs4998557 (SOD1) CRO matere	rs4998557 (SOD1) CRO otroci	rs4880 (SOD2) CRO matere	rs4880 (SOD2) CRO otroci	rs1049982 (CAT) CRO matere	rs1049982 (CAT) CRO otroci
100211	GG	AG	AG	AA	TT	CT
100212	GG		GG		CC	
100213	GG	GG	AG	AG	CT	CC
100214	AG		AA		CT	
100215	GG		GG		CC	
100216	AG		AA		CC	
100217	GG		AG		CC	
100218	AG		GG		CT	
100219	GG	GG	AG	GG	CC	CT
100220	GG		AG		CT	
100221	GG		AG		CT	
100222	AG		AG		CT	
100223	GG		AA		CT	
100224	AG		AG		CT	
100225	AG		GG		CT	
100226	GG	GG	AA	AG	CT	CT
100227	GG		AG		CT	
100228	GG	GG	AA	AA	CC	CT
100229	GG		AA		CT	
100230	GG	GG	GG	GG	CT	CC
100231	GG	AG	AA	AA	CT	CC
100232	GG		AG		CT	
100233	GG	GG	GG	GG	CT	CT
100234	GG		AA		CC	

Preglednica XXIX: Rezultati genotipizacije pri novorojenčkih iz Slovenije

št. vzorca	rs4998557 (SOD1)	rs4880 (SOD2)	rs1049982 (CAT)	št. vzorca	rs4998557 (SOD1)	rs4880 (SOD2)	rs1049982 (CAT)
400070	GG	AG	TT	400132	GG	AG	CC
400073	GG	GG	CT	400133	AG	AG	TT
400074	GG	GG	TT	400135	GG	GG	CC
400075	AG	GG	CT	400136	GG	AG	CC
400076	AG	AA	CC	400137	GG	AG	CC
400077	GG	GG	CT	400138	GG	AG	CT
400078	GG	AA	CT	400140	GG	AA	CT
400085	GG	AG	TT	400141	AG	AA	CT
400089	GG	AG	CC	400143	AG	AA	CC
400090	AG	GG	CC	400144	GG	AG	CC
400091	GG	AA	CC	400145	GG	GG	CT
400093	AG	GG	CT	400146	GG	AG	CT
400096	GG	GG	CT	400147	GG	AG	CC
400097	GG	AA	CC	400148	AG	AA	CT
400098	AG	AG	CT	400149	GG	AG	CC
400099	AG	AG	CC	400150	GG	AG	CC
400100	GG	AG	CT	400151	GG	GG	CC
400101	GG	AG	CT	400155	GG	AG	CT
400103	GG	AG	CC	400156	GG	GG	CC
400104	GG	GG	CT	400157	GG	AG	CC
400105	GG	GG	TT	400158	GG	AG	CC
400106	AG	GG	CC	400159	GG	GG	TT
400107	AG	AA	CT	400160	GG	AG	CC
400108	GG	GG	CC	400161	GG	AG	CT
400109	GG	AA	CT	400162	GG	AG	CC
400110	GG	AG	CC	400165	GG	AG	CT
400111	GG	AG	CC	400166	GG	GG	CT
400112	GG	GG	CC	400167	GG	GG	CC
400113	GG	AG	CT	400168	GG	AG	CC
400114	GG	AA	CC	400171	GG	AG	CT
400115	AG	GG	CC	400172	GG	AA	TT
400116	GG	AG	CT	400175	GG	AA	TT
400117	GG	GG	CT	400177	GG	AG	CT
400121	AG	AG	TT	400179	GG	AG	CC
400122	GG	GG	CC	400180	GG	AA	TT
400123	GG	AA	TT	400181	GG	GG	CC
400124	GG	AG	CT	400182	GG	AA	CT
400126	GG	AG	CT	400185	GG	GG	CT
400129	AG	AG	CC	400186	GG	AG	CC
400130	GG	GG	CC	400187	GG	GG	CC
400131	GG	AA	CT	400188	GG	GG	CT

št. vzorca	rs4998557 (SOD1)	rs4880 (SOD2)	rs1049982 (CAT)	št. vzorca	rs4998557 (SOD1)	rs4880 (SOD2)	rs1049982 (CAT)
400189	AG	AG	CC	400252	GG	AG	CT
400190	AG	AG	CC	400253	AG	GG	TT
400191	GG	AG	CT	400254	AG	AA	TT
400192	GG	GG	TT	400255	GG	AG	CC
400193	GG	AG	CC	400256	GG	GG	CT
400194	GG	AG	CC	400259	GG	AG	CC
400195	GG	AG	CT	400260	AG	AG	CC
400196	GG	GG	CT	400261	GG	GG	CT
400198	GG	GG	CC	400262	GG	AG	CT
400199	GG	AA	CT	400263	GG	AG	CT
400200	GG	AG	CT	400267	GG	AG	CC
400201	AG	AA	TT	400268	GG	GG	CT
400206	GG	AG	CT	400269	GG	AG	CC
400207	AG	AG	CT	400270	AG	AG	CT
400208	GG	AG	CT	400271	AG	AA	CC
400209	AG	GG	CT	400273	GG	GG	CC
400210	GG	AG	CC	400274	GG	GG	CC
400211	GG	AG	CC	400275	AG	AG	CC
400212	GG	AG	TT	400276	GG	GG	CC
400213	GG	AG	CT	400277	AG	AG	CT
400214	GG	AG	CT	400280	AG	AG	CC
400215	GG	GG	TT	400281	GG	AG	CT
400221	GG	AG	CC	400282	GG	AA	CT
400222	GG	AG	CC	400283	AG	GG	CT
400226	GG	AG	CC	400284	AG	GG	CT
400228	AG	AG	CT	400285	GG	GG	CC
400229	GG	GG	CT	400286	AG	AG	CT
400230	GG	AA	CT	400287	GG	GG	CC
400231	AG	AG	CC	400289	GG	AG	CT
400232	AG	GG	CT	400290	AG	AG	CC
400233	GG	AG	CC	400292	GG	AG	CC
400235	GG	GG	CC	400293	AG	AA	TT
400237	GG	AG	TT	400294	GG	AA	TT
400238	GG	AG	CT	400295	GG	AA	CT
400239	GG	GG	CC	400296	GG	AA	CC
400240	GG	AG	CT	400297	AG	AA	CC
400241	GG	AG	CC	400298	GG	GG	CC
400242	GG	GG	CT	400299	GG	GG	CT
400248	GG	AG	CC	400300	GG	AG	CC
400250	GG	AG	CT	400301	GG	AG	CT
400251	GG	AG	CT	400302	GG	AG	TT

Preglednica XXX: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) pri hrvaških otrocih

rs4998557 (<i>SOD1</i>) CRO otroci		COG	RC	EC	LANG	FM	GM	MOT	COG*LANG* MOT
GG (N = 94)	SV	60,02	28,09	28,19	56,28	41,14	57,36	98,50	335890,20
	SD	4,53	3,75	5,02	7,80	2,34	2,92	4,20	73000,55
AG (N = 27)	SV	60,48	28,78	29,30	58,07	40,63	57,33	97,96	348534,04
	SD	4,35	3,82	4,92	7,35	2,90	2,63	4,27	76387,31

Pomen okrajšav v preglednici: SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXI: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs4880 (*SOD2*) pri hrvaških otrocih

rs4880 (<i>SOD2</i>) CRO otroci		COG	RC	EC	LANG	FM	GM	MOT	COG*LANG* MOT
GG (N = 34)	SV	61,18	28,76	29,38	58,15	41,06	57,76	98,82	354837,00
	SD	4,56	3,32	5,37	7,79	2,10	2,74	3,77	75877,50
AG (N = 58)	SV	59,66	27,60	27,81	55,41	41,00	57,16	98,16	328301,12
	SD	4,33	4,11	4,87	7,99	2,70	3,20	4,66	74985,72
AA (N = 29)	SV	59,83	28,90	28,59	57,48	41,03	57,28	98,31	340626,72
	SD	4,61	3,40	4,79	6,80	2,47	2,19	3,80	66798,76

Pomen okrajšav v preglednici: SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXII: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs1049982 (*CAT*) pri hrvaških otrocih

rs1049982 (<i>CAT</i>) CRO otroci		COG	RC	EC	LANG	FM	GM	MOT	COG*LANG* MOT
CC (N = 53)	SV	59,17	28,04	27,60	55,64	40,92	56,87	97,79	324098,19
	SD	3,85	3,17	4,59	6,79	2,26	3,32	4,47	60825,29
CT (N = 54)	SV	60,61	28,26	28,85	57,11	41,11	57,59	98,70	345734,96
	SD	4,72	4,32	5,41	8,56	2,73	2,29	3,85	79223,34
TT (N = 13)	SV	62,15	29,15	30,38	59,54	41,31	58,38	99,69	373553,54
	SD	5,26	3,69	4,54	7,31	2,21	2,82	4,42	87818,10

Pomen okrajšav v preglednici: SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXIII: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) pri hrvaških materah

rs4998557 (<i>SOD1</i>) CRO matere		COG	LANG	MOT	COG*LANG* MOT
GG (N = 102)	SV	60,77	56,67	98,82	343949,36
	SD	4,74	7,63	4,40	75382,48
AG + AA (N = 29)	SV	61,66	59,00	99,55	366348,69
	SD	4,71	8,29	3,17	79820,59

Pomen okrajšav v preglednici: SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; LANG: jezikovna; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXIV: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs4880 (*SOD2*) pri hrvaških materah

rs4880 (<i>SOD2</i>) CRO matere		COG	LANG	MOT	COG*LANG* MOT
GG (N = 34)	S V	61,50	56,41	99,44	350019,97
	S D	5,86	8,60	3,77	86072,68
AG (N = 61)	S V	60,34	56,89	98,08	340007,61
	S D	4,00	7,86	4,53	73392,77
AA (N = 33)	S V	60,55	57,09	99,55	346978,85
	S D	4,46	6,28	3,45	66240,42

Pomen okrajšav v preglednici: SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število

Preglednica XXXV: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs1049982 (*CAT*) pri hrvaških materah

rs1049982 (<i>CAT</i>) CRO matere		COG	LANG	MOT	COG*LANG* MOT
CC (N = 54)	S V	61,04	57,87	99,52	355088,31
	S D	4,73	8,06	4,11	77266,49
CT (N = 62)	S V	61,11	56,48	98,56	344412,11
	S D	4,96	8,06	3,98	80256,14
TT (N = 18)	S V	60,61	57,28	98,50	345307,56
	S D	4,62	6,28	4,48	65002,36

Pomen okrajšav v preglednici: SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število

Preglednica XXXVI: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs4998557 (*SOD1*) pri slovenskih otrocih

rs4998557 (<i>SOD1</i>) SLO otroci		COG_ scaled	RC_ scaled	EC_ scaled	LANG_ scaled	FM_ scaled	GM_ scaled	MOT_ scaled	COG*LANG* MOT_ scaled
GG (N = 197)	S V	12,97	12,73	9,32	22,06	12,30	9,92	22,22	6603,51
	S D	2,56	2,69	2,36	4,27	1,88	1,68	2,84	2627,82
AG (N = 54)	S V	13,07	12,93	9,04	21,96	12,94	10,09	23,04	6833,35
	S D	2,06	2,73	2,24	4,14	2,01	1,10	2,67	2523,89

Pomen okrajšav v preglednici: scaled: v obliki lestvice; SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXVII: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs4880 (*SOD2*) pri slovenskih otrocih

rs4880 (<i>SOD2</i>) SLO otroci		COG_ scaled	RC_ scaled	EC_ scaled	LANG_ scaled	FM_ scaled	GM_ scaled	MOT_ scaled	COG*LANG* MOT_ scaled
GG (N = 59)	S V	13,25	12,88	9,05	21,93	12,36	9,81	22,17	6677,47
	S D	2,43	2,58	2,04	4,10	1,89	1,46	2,77	2708,64
AG (N = 139)	S V	13,29	13,03	9,47	22,50	12,52	10,05	22,57	6984,56
	S D	2,37	2,74	2,60	4,50	1,99	1,64	2,86	2583,27
AA (N = 53)	S V	11,92	11,98	8,96	20,94	12,32	9,87	22,19	5756,00
	S D	2,47	2,60	1,84	3,47	1,82	1,55	2,78	2357,14

Pomen okrajšav v preglednici: scaled: v obliki lestvice; SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti rezultatov BSID-III glede na genotip preučevanega polimorfizma rs1049982 (CAT) pri slovenskih otrocih

rs1049982 (CAT) SLO otroci		COG_ scaled	RC_ scaled	EC_ scaled	LANG_ scaled	FM_ scaled	GM_ scaled	MOT_ scaled	COG*LANG* MOT_ scaled
CC (N = 117)	SV	12,94	12,90	9,50	22,40	12,54	10,07	22,61	6823,80
	SD	2,50	2,70	2,46	4,38	1,86	1,56	2,66	2760,90
CT (N = 101)	SV	12,99	12,66	9,01	21,67	12,36	9,83	22,19	6449,25
	SD	2,41	2,74	2,16	4,13	1,96	1,64	3,02	2425,44
TT (N = 33)	SV	13,18	12,67	9,18	21,85	12,33	9,94	22,27	6670,73
	SD	2,53	2,62	2,40	4,05	2,07	1,46	2,73	2581,24

Pomen okrajšav v preglednici: scaled: v obliki lestvice; SV: srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; COG: kognitivna; RC: razumevanja; EC: izražanja; LANG: jezikovna; FM: fine motorike; GM: grobe motorike; MOT: motorična funkcija

Preglednica XXXIX: Povprečne koncentracije Hg_{cel} in MeHg, izmerjene pri materah hrvaških otrok in hrvaških otrocih

koncentracija Hg [ng/g]	N	$\bar{x} \pm SD$
hairHg	212	865,12 ± 1132,03
hairMeHg	44	2073,75 ± 1386,31
mHg	211	2,81 ± 2,63
mMeHg	48	5,62 ± 3,64
cordHg	196	4,34 ± 4,53
cordMeHg	44	9,23 ± 6,20
milkHg	117	0,27 ± 0,39
buHg	122	0,67 ± 3,64

Pomen okrajšav v preglednici: \bar{x} : srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; hair: lasje; m: venska kri; cord: popkovnična kri; milk: mleko; bu: urin novorojenčka

Preglednica XL: Povprečne koncentracije Hg_{cel} in MeHg, izmerjene pri materah slovenskih otrok

koncentracija Hg [ng/g]	N	$\bar{x} \pm SD$
hairHg	404	352,76 ± 316,88
hairMeHg	10	1350,70 ± 431,12
cordHg	423	2,00 ± 1,75
cordMeHg	14	6,77 ± 2,94
milkHg	246	0,27 ± 0,30

Pomen okrajšav v preglednici: \bar{x} : srednja vrednost; SD: standardna deviacija; N: število; hair: lasje; cord: popkovnična kri; milk: mleko