

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Babić Božović

GLOBALNA DNA METILACIJA I TRISOMIJA 21

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Babić Božović

GLOBALNA DNA METILACIJA I TRISOMIJA 21

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

Mentori rada: prof.dr.sc. Bojana Brajenović-Milić,

dr.sc. Aleksandra Stanković, viši znanstveni suradnik

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2013. na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Blaženka Grahovac

2. prof.dr.sc. Maja Vlahović

3. prof.dr.sc. Oleg Petrović

4. prof.dr.sc. Bojana Brajenović-Milić

5. dr.sc. Aleksandra Stanković, viši znanstveni suradnik

Rad ima 98 listova.

UDK: _____

Zahvala

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj mentorici, profesorici dr.sc. Bojanu Brajenović-Milić, na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju, savjetima i vodstvu kroz sve godine mojeg doktorskog studija i tijekom izrade ovog rada.

Veliku zahvalost dugujem i mentorici dr.sc. Aleksandri Stanković bez čijeg vodstva, znanja i nesebične pomoći ovaj rad ne bi bilo moguće ostvariti.

Posebnu zahvalu upućujem kolegicama dr.sc. Jadranki Vraneković i dr.sc. Maji Živković koji su mi bili bezgranična potpora i pomoći u svakom trenutku izrade ovoga rada.

Hvala pročelniku Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku prof.dr.sc. Miljenku Kapoviću na potpori i poticaju mojem znanstvenom radu.

Veliko hvala svim mojim kolegicama i kolegama te tehničarkama na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku na ukazanom razumijevanju i pomoći tijekom istraživanja.

Posebno se zahvaljujem Hrvatskoj zajednici za Down sindrom te svim roditeljima i njihovoј djeci koji su svojim sudjelovanjem omogućili ovo istraživanje.

Mojoj dragoj obitelji i priateljima zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

SAŽETAK

Osnovni **cilj** ovog rada bio je utvrditi povezanosti globalne DNA metilacije i nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 tijekom oogeneze i razvoja prirođenih srčanih grešaka (engl. congenital heart defects, CHD) u sklopu Down sindroma (DS). Dodatno, ispitivan je i utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika na globalnu DNA metilaciju, kao što su *MTHFR* C677T polimorfizam, spol, starosna dob, indeks tjelesne mase, unos folata putem prehrane, perikoncepcijski unos pripravaka folata, uživanje duhanskog dima i alkohola te primjena lijekova.

Ispitanici i metode: U istraživanje je bilo uključeno 94 majki djece s DS-om majčinog podrijetla u kojih je točno određena mejotička dioba u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21. Kontrolnu grupu su činile majke zdrave djece i uredne obiteljske i osobne anamneze (N=100). Utjecaj globalne DNA metilacije na razvoj sindromskog CHD-a ispitivan je na uzorku od 42 osobe s DS-om koje su ujedno djeca majki uključenih u ovo istraživanje. Globalna DNA metilacija analizirana je u limfocitima periferne krvi, kvantifikacijom metilacije LINE-1 pomoću MethylLight metode. Genotipizacija *MTHFR* C677T polimorfizma izvedena je PCR-RFLP metodom.

Rezultati: Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om je statistički značajno niža nego u majki zdrave djece ($P=0,000$), ali se ne razlikuje ovisno o mejotičkoj diobi u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21 ($P=1,000$), kao ni u odnosu na prisustvo CHD-a u njihove djece ($P=0,951$). Vrijednost globalne DNA metilacije je statistički značajno povezana s kombinacijom *MTHFR* C677T genotip/prehrana ($R^2=4,5\%$; $P=0,046$). Najniže vrijednosti globalne DNA metilacije su imale majke CT+TT genotipa i prehrane siromašne folatima. Doprinos ovog čimbenika na varijabilnost globalne DNA metilacije još je veći u majki kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma tijekom prve mejotičke diobe ($R^2=6,2\%$; $P=0,036$), a najveći udio utvrđen je u majki djece s DS-CHD⁺ ($R^2=9,9\%$; $P=0,026$), i to posebno u majki djece s DS-om i septalnim defektom ($R^2=15,4\%$; $P=0,018$). Globalna DNA

metilacija u ispitanika s DS-om se statistički značajno ne razlikuje ovisno o prisutnosti CHD-a ($P=1,000$), ali ju statistički značajno opisuje spol osobe ($R^2=19,1\%$; $P=0,025$).

Zaključak: U našem istraživanju utvrđena je globalna DNA hipometilacija u majki djece s DS-om regularnog tipa majčinog podrijetla što ju opisuje kao mogućeg čimbenika rizika za nepravilno razdvajanje kromosoma 21 tijekom oogeneze. Iako nije utvrđena povezanost globalne DNA metilacije i CHD-a u sklopu DS-a, njen se utjecaj ne može potpuno isključiti jer na njene vrijednosti utječe *MTHFR* genotip i prehrana majke, čiji bi se učinak mogao ispoljiti na većem broju ispitanika.

Ključne riječi: DNA metilacija, globalna; Kromosomalno nerazdvajanje; Prirođene srčane greške; Down sindrom

SUMMARY

The aim of this study was to determine the association between global DNA methylation and nondisjunction of chromosome 21 during oogenesis and occurrence of congenital heart defects (CHD) in Down syndrome (DS). Additionally, the impact of endogenous and exogenous factors on global DNA methylation was analyzed, including *MTHFR* C677T polymorphism, gender, age, body mass index, intake of folate through diet, periconceptional folic acid supplementation, smoking, alcohol drinking and medication use.

Patients and methods: A total of 94 mothers of children with DS of maternal origin and with defined meiotic stage of chromosome nondisjunction have been enrolled in this study. The control group consisted of mothers of healthy children with no personal or family history (N=100). The influence of global DNA methylation on development of CHD was studied in 42 DS probands who were the children of mothers included in this study. Global DNA methylation was analyzed in peripheral blood lymphocytes by quantification of LINE-1 methylation using MethylLight method. Genotyping of *MTHFR* C677T polymorphism was performed by PCR-RFLP.

Results: Global DNA methylation in mothers of children with DS was significantly lower than in mothers of healthy children ($P=0.000$), but no significant differences were found regarding the meiotic stage of nondisjunction of chromosome 21 ($P=1.000$) or regarding the presence of CHD in their children ($P=0.951$). Combination of *MTHFR* C677T genotype/diet significantly influenced global DNA methylation ($R^2=4.5\%$, $P=0.046$). The lowest values of global DNA methylation were determined in mothers with CT+TT genotype and low folate diet. The contribution of these factors was even higher among mothers of children with trisomy 21 resulted from meiotic one nondisjunction ($R^2=6.2\%$, $P=0.036$). The highest effect was found in mothers of children with DS-CHD⁺ ($R^2=9.9\%$, $P=0.026$), particularly among those who had children with DS and septal heart defect ($R^2=15.4\%$, $P=0.018$). In DS probands, no significant differences in global DNA methylation were found according to the presence of

CHD ($P=1.000$), but values of global DNA methylation were significantly influenced by gender ($R^2=19.1\%$; $P=0.025$).

Conclusion: Our findings revealed global DNA hypomethylation in mothers of children with DS, suggesting that this is a possible risk factor for nondisjunction of chromosomes 21 during oogenesis 21. Although, global DNA methylation was not significantly associated with development of CHD in DS, its influence can not be completely excluded, since the significant impact of *MTHFR* genotype and diet on global DNA methylation in mothers of DS-CHD⁺ was determined. Further analyses on larger sample are needed to provide an answer to this question.

Keywords: DNA methylation, global; Nondisjunction, genetic; Congenital heart defects, Down syndrome

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. DNA metilacija.....	1
1.2. DNA metilacija i stabilnost genoma	4
1.3. Utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika na DNA metilaciju.....	6
1.3.1. Egzogeni čimbenici.....	7
1.3.2. Metabolizam folata i DNA metilacija.....	8
1.4. DNA metilacija i prirođene srčane greške	9
1.5. Sindrom Down i DNA metilacija.....	14
2. Cilj istraživanja	17
3. Ispitanici i metode.....	18
3.1. <i>Ispitanici</i>	18
3.2. <i>Metode</i>	18
3.2.1. <i>Izolacija genomske DNA</i>	18
3.2.2. <i>Genotipizacija MTHFR C677T polimorfizma</i>	19
3.2.3. <i>Bisulfitna konverzija</i>	21
3.2.4. <i>Utvrđivanje globalne DNA metilacije MethyLight metodom</i>	21
3.2.4.1. <i>Računanje postotka metilacije</i>	23
3.2.5. <i>Anketni upitnik</i>	24
3.3. <i>Statistička obrada podataka</i>	24
4. REZULTATI.....	26
4.1. Učestalost <i>MTHFR C677T polimorfizma</i> u majki djece s DS-om	28
4.2. Globalna DNA metilacija.....	29
4.3. Utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika na globalnu DNA metilaciju.....	30
4.4. Utvrđivanje kriterijske vrijednosti globalne DNA metilacije kao prediktora za trisomiju 21	36
4.5. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om u odnosu na mejotičku diobu u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21	37

4.6. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om u odnosu na prisutnost CHD-a u djeteta s DS-om	42
4.7. Globalna DNA metilacija u osoba s DS-om.....	49
5. RASPRAVA.....	52
6. ZAKLJUČCI.....	66
7. LITERATURA.....	67
8. PRILOZI	91
9. ŽIVOTOPIS	95

1. UVOD

Centralna dogma molekularne biologije zasniva se na pretpostavci da je u primarnom slijedu nukleotida genomske deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid – DNA) pohranjena temeljna genetička informacija koja se izražava prepisivanjem i prevođenjem (1). Međutim, osim genetičkog koda u genomu čovjeka postoji i epigenetički kod koji regulira gensku aktivnost u svakoj stanici (2). Epigenetičke modifikacije su nasljedne, reverzibilne promjene genske ekspresije bez promjena u DNA slijedu. Osnovni epigenetički mehanizmi su DNA metilacija, posttranslacijske modifikacije histona i utišavanje gena ovisno o malim molekulama RNA. Ovi mehanizmi se međusobno nadopunjaju i čine epigenetičku mrežu koja precizno regulira aktivnost pojedinih gena ovisno o stadiju razvoja i vrsti stanice te u svakoj stanici čini jedinstven epigenetički biljeg koji se prenosi tijekom stanične diobe, ali i transgeneracijski (3). Uspostavu epigenetičke mreže određuje struktura gena i njegovog promotora, kao i stalno međudjelovanje različitih egzogenih i endogenih čimbenika. Epigenetičke modifikacije se smatraju glavnim mehanizmom kojim okolišni čimbenici utječu na gensku ekspresiju, te na taj način mogu pridonijeti nastanku različitih bolesti (2).

1.1. DNA metilacija

DNA metilacija je jedan od najvažnijih epigenetičkih mehanizama, a uključena je u regulaciju brojnih staničnih procesa kao što su utišavanje gena za vrijeme embrionalnog razvoja, inaktivaciju X kromosoma, uspostavu genomskega utiskivanja (engl. genomic imprinting) i očuvanje stabilnosti kromosoma (4). U biokemijskom smislu, DNA metilacija predstavlja kovalentno vezivanje metilne skupine na citozin koji prethodi (5') gvaninu unutar CpG dinukleotida. Oko 80% CpG dinukleotida u ljudskom genomu je metilirano (5,6). Metilirani citozin je podložan spontanoj deaminaciji u timin (7-9). Mehanizmi popravka DNA

ne prepoznaju ovu promjenu te je učestalost CpG dinukleotida u ljudskom genomu puno rjeđa od očekivane (10). Njihovu frekvenciju održavaju nemetilirani CpG dinukleotidi koji su grupirani unutar takozvanih CpG otoka (engl. CpG islands). Analizom kromosoma 21 i 22 (oko 2% ljudskog genoma) utvrđeno je da su to područja dulja od 500 parova baza koja posjeduju više od 55% nukleotida s bazama G+C, pri čemu je omjer opažene i očekivane frekvencije $CpG \geq 0,65$ (11). CpG dinukleotidi su u klasterima raspoređeni u promotorskim regijama gena i visoko ponovljenim sekvencama, elementima kao što su dugi raspršeni nukleotidni elementi (engl. long interspersed nucleotide elements – LINE) i Alu repetativni elementi (9,11,12). Humani genom sadrži oko 1,4 milijuna Alu i pola milijuna LINE elemenata. CpG dinukleotidi smješteni u ovim ponavljajućim segmentima su obično metilirani što onemogućava njihovu ekspresiju (13). LINE-1 elementi, koji su najbrojnija porodica LINE, i Alu elementi mogu se koristiti kao markeri za globalnu DNA metilaciju. Oko 70% gena ima CpG otoke u promotorskoj regiji, uključujući sve "kućepaziteljske" gene (engl. housekeeping gene) i oko 40% tkivno specifičnih gena (8,9,14-17). Ovi otoci obično nisu metilirani što omogućava normalnu transkripciju gena. Ukoliko su CpG otoci u promotorskoj regiji metilirani, kao na primjer kod utisnutih gena (engl. imprinted genes) i gena na inaktivnom X kromosomu, neće doći do genske ekspresije (6). DNA metilacija inhibira transkripciju gena na način da dodana metilna skupina interferira s vezanjem nekih transkripcijskih faktora (18,19). Također, metilacija CpG uvjetuje vezivanje transkripcijskih represora (engl. methyl-CpG binding proteins – MBD) koji se specifično vežu na metiliranu DNA. Ovi represori djeluju kao kompleksi s enzimima koji kataliziraju modifikacije histona kao što acetilacija, metilacija, sumoilacija ili fosforilacija. Smatra se da DNA metilacija i posttranslacijske modifikacije histona djeluju koordinirano u organizaciji strukture kromatina (20). U regulaciji strukture kromatina sudjeluju i proteinski kompleksi koji mijenjaju položaj i strukturu nukleosoma. Promjene strukture kromatina putem DNA metilacije, posttranslacijskih modifikacija histona i remodeliranja nukleosoma predstavljaju epigenetičku informaciju koja je uključena u

regulaciju ekspresije gena, a s kojom su povezane mnoge biološke funkcije eukariotske stanice.

Obrazac DNA metilacije formira se tijekom gametogeneze i ranog embrionalnog razvoja kada se reprogramiraju epigenetički biljezi naslijeđeni od roditelja (3,21). Reprogramiranje se zasniva na demetilaciji i ponovnoj metilaciji DNA. Demetilacija može biti pasivna i aktivna. Aktivna DNA demetilacija je još nedovoljno razjašnjena, ali je predloženo nekoliko mehanizama uključujući uklanjanje metilnih skupina putem mehanizma popravka DNA izrezivanjem baza, kao i direktno uklanjanje metilne skupine reakcijom hidrolize, oksidacije ili posredovanjem nekog enzima (3,22-26). Pasivna demetilacija je ovisna o replikaciji DNA, pri čemu se metilacija novosintetiziranih DNA lanaca postupno smanjuje uslijed nedostatka ili inhibicije enzima DNA metiltransferaze 1 (21,27). DNA metiltransferaze (engl. DNA methyltransferase – DNMT) su enzimi odgovorni za DNA metilaciju (28). Upostavu obrasca metilacije kataliziraju enzimi DNMT3A i DNMT3B, uz prisustvo kofaktora DNMT3L, dok održavanje obrasca metilacije provodi enzim DNMT1.

Reprogramiranje u rano embrionalno doba započinje odmah nakon oplođenje, a uključuje sve gene osim onih koji pokazuju fenomen genomskega utiskivanja (29). Genomsko utiskivanje je posljedica epigenetičkih modifikacija koje dovode do ekspresije samo jednog alela istog gena, ovisno o roditeljskom podrijetlu (30). Do sada je poznato barem 80 utisnutih gena čovjeka, a regije koje su uključene u taj proces nazivaju se različito metiliranim regijama (engl. differentially methylated regions). Nakon implantacije blastociste ponovno se uspostavlja obrazac DNA metilacije koji se stabilno prenosi tijekom staničnih dioba (21). Reprogramiranje u gametogenezi započinje u vrijeme migracije spolnih prastanica, a uključuje sve gene osim nekih retrotranspozona (31). Spolne prastanice nastaju iz epiblasta, vanjskog sloja embrioblasta, tijekom 2. tjedna gestacije. Između 4. i 6. tjedna gestacije ove stanice migriraju u područje budućih gonada (32). Tijekom ovog razdoblja brišu se roditeljski obrasci DNA metilacije, pri čemu spolne prastanice ulaze u stanje mitotičkog i mejotičkog mirovanja kako bi se sprječilo premještanje retrotranspozona tijekom replikacije nemetilirane

DNA (31,33). Obrazac DNA metilacije se nanovo uspostavlja ovisno o spolu ploda, što rezultira funkcionalnom nejednakošću genoma. Vrijeme kada se događa ponovna metilacija također ovisi o spolu ploda. Kod ploda muškog spola metilacija započinje odmah nakon demetilacije, a završava nedugo nakon rođenja, dok kod ženskog spola metilacija započinje nakon rođenja, a završava neposredno prije ovulacije (35,36).

1.2. DNA metilacija i stabilnost genoma

U mnogim kompleksnim bolestima kao što su tumori, ateroskleroza, Alzheimer-ova bolest i psihijatrijski poremećaji često je prisutna globalna DNA hipometilacija kao i specifična hipermetilacija nekih gena (12). Globalna DNA hipometilacija povezana je s nestabilnošću genoma, a gen specifična hipermetilacija s utišavanjem, isključivanjem gena (engl. gene silencing). Hipometilacija DNA uglavnom zahvaća nekodirajuće dijelove DNA, odnosno introne te regije između gena, prvenstveno ponavljajuće regije i transpozone (37,38). Poznato je da veći dio genoma čovjeka čine nekodirajući DNA sljedovi, a više od 50% čine ponavljajući sljedovi DNA, uključujući ponavljanja jednostavnih sljedova i transpozone (8).

Ponavljanja jednostavnih sljedova, poput satelitne ili telomerne DNA su visokometilirana i ne predstavljaju funkcionalnu genetičku informaciju (39). Njihova biološka funkcija temelji se na strukturnoj organizaciji kromatina koja je neophodna za pravilno odvijanje staničnog ciklusa, sparivanje i razdvajanje kromosoma (39). Centromera je specijalizirana regija kromosoma koja predstavlja mjesto udruživanja sestrinskih kromatida i osigurava pravilno razdvajanje kromosoma tijekom stanične diobe. Telomere su neophodne za replikaciju linearne DNA te osiguravaju stabilnost kromosoma (40). Međutim, osim same sekvene DNA, pravilnu funkciju ovih kromosomskih regija uvjetuje i jedinstven epigenetički biljeg, karakterističan za konstitutivni heterokromatin, a uključuje metilaciju lizinskih ostataka histona i DNA hipermetilaciju (41-43). DNA metilacija utječe na strukturu i dinamiku kromatina u ovim regijama kromosoma. Proteini pridruženi centromeri koji formiraju

kinetohoru vežu se upravo na metiliranu DNA što omogućava pravilno formiranje i lokalizaciju kinetohornog sustava (44,45). Hipometilacija satelitnih regija povezuje se s nastankom strukturalnih i numeričkih aberacija kromosoma u tumorskim stanicama i u stanicama pacijenata sa sindromom imunodeficijencije, centromerne nestabilnosti i anomalija lica (engl. Immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome – ICF) koji je uzrokovani mutacijom DNMT3B gena (46-54). Gubitak funkcije telomera, uslijed promjena u slijedu DNA ili epigenetičkih promjena, također može dovesti do abnormalnosti telomera i nestabilnosti genoma (55-58). Istraživanja pokazuju da DNA metilacija ima ulogu u sprječavanju rekombinacije te da hipermetilacija centromerne i telomerne DNA onemogućava rekombinaciju unutar ovih regija (43,59-61). Poznato je da rekombinacije između homolognih kromosoma nisu ravnomjerno raspoređene u genomu čovjeka već se javljaju u specifičnim regijama kromosoma veličine 1-2 kb (engl. recombination hotspots) (62-64). Ova mesta rekombinacije su vrlo dinamična, a DNA metilacija sudjeluje u regulaciji obrasca rekombinacije kromosoma što djelomično objašnjava i povezanost broja rekombinacija i sadržaja GC baza (59,61).

Transpozoni su pokretni genetički elementi (engl. transposable elements) koji se premještaju unutar genoma putem DNA ili RNA intermedijara čime omogućavaju horizontalni prijenos genetičke informacije, neovisno o kromosomima (8,38). Transpozoni se uglavnom nalaze na svim kromosomima i to u eukromatinskim područjima te su znatno manje prisutni u heterokromatinskim regijama u kojima se nalazi satelitna DNA (8,65,66). Takva raspodjela objašnjava se njihovom vjerojatnom ulogom u pravilnom odvijanju staničnog ciklusa. Više od 40% genoma čovjeka čine retrotranspozoni koji se premještaju reverznom transkripcijom RNA intermedijara (8). Retrotranspozoni se dijele na elemente s dugim terminalnim ponavljanjima (engl. Long terminal repeats – LTR), kratke raspršene elemente (engl. Short interspersed nuclear elements – SINE) i LINE elemente. Smatra se da su transpozoni doprinjeli evolucijskom razvoju novih gena, preslagivanju kromosomske DNA i raznolikosti genoma (8). Naime, prilikom njihovog premještanja učestalo se prenosi i

susjedna DNA, koja integracijom u aktivne gene, može dovesti do stvaranja novih regulatornih ili kodirajućih sljedova. Međutim, tijekom evolucije ove sekvene su nakupile niz mutacija koje su pogodile i gene neophodne za njihovu transpoziciju te velika većina pokretnih elemenata u genomu čovjeka danas nije aktivna. Danas je aktivno još samo oko 100 kopija LINE-1 (8,67,68). Kao najbrojnija porodica LINE elemenata, LINE-1 čini 17% do 25% ljudskog genoma (8,11). Ekspresija pokretnih genetičkih elemenata je precizno regulirana epigenetičkim mehanizmima (66). Osim tijekom kratkog perioda globalne demetilacije u embrionalnom razdoblju, ovi elementi su hipermetilirani i utišani (3,19,66). Smatra se da hipometilacija ovih nekodirajućih dijelova DNA doprinosi nestabilnosti genoma. Hipometilacija transpozona koji još imaju aktivne promotore dovodi do njihove transkripcije i aktivacije što može utjecati na ekspresiju drugih gena (68-70). Premještanjem na novo mjesto u genomu transpozoni mogu inducirati mutacije te dovesti do promjene ekspresije nekog gena, odnosno narušiti strukturu gena ili proteina. Također, uslijed DNA hipometilacije može doći do rekombinacije između raspršenih elemenata integriranih na različita mesta i nastaka različitih strukturnih promjena, uključujući inverzije, translokacije, duplikacije ili delecije (71).

1.3. Utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika na DNA metilaciju

Epigenetički biljezi se mogu mijenjati tijekom života pod utjecajem različitih endogenih i egzogenih čimbenika (72-76). Endogenim čimbenicima se mogu smatrati genotip, spol i rasna pripadnost, dok se prehrana, tjelesna težina, aktivnost, uživanje duhanskog dima i alkohola, te izloženost kancerogenim faktorima i bakterijskim infekcijama smatraju egzogenim čimbenicima (73,74). Ovisno o prirodi i intenzitetu djelovanja čimbenika, te trenutku djelovanja, epigenetske promjene mogu dovesti do trajnih promjena u tkivu, strukturi i funkciji organa te fenotipskih promjena (72,75). Te promjene mogu biti kratkoročne, ali i dugoročne, poput onih koje su neophodne za diferencijaciju stanica. Stoga epigenetičko

reprogramiranje tijekom razvoja ima trajan učinak i na zdravlje potomaka (72,75). Epigenetičke promjene se s godinama akumuliraju te u konačnici doprinose razvoju različitih kompleksnih bolesti povezanih sa starosnom dobi, kao što su tumori, kardiovaskularne i plućne bolesti, diabetes, pretilost, neurološke bolesti. Dokazano je da jednojajčani blizanci koji žive u različitim uvjetima, s godinama akumuliraju značajne razlike u obrascu DNA metilacije (76).

1.3.1. Egzogeni čimbenici

Brojne studije usmjерene su na povezanost između različitih poremećaja i statusa globalne DNA metilacije u limfocitima periferne krvi kao mogućeg biomarkera u detekciji, dijagnozi ili prognozi bolesti (77-84). Ove studije naglašavaju važnost utjecaja različitih čimbenika na DNA metilaciju. Iako su često kontradiktorna, većina istraživanja ukazuje da se s povećanjem starosne dobi snižava status globalne DNA metilacije, kao i da je globalna DNA metilacija viša kod osoba muškog spola u odnosu na ženski spol (73-88). Izloženost nekim kancerogenim tvarima poput benzena, olova, arsena te onečišćenju zraka nastalog izgaranjem fosilnih goriva uglavnom se povezuje sa sniženim statusom globalne DNA metilacije (89-93). Smatra se da izloženost dimu cigarete tijekom embrionalnog razvoja može dovesti do promjena globalne DNA metilacije u odrasloj dobi, dok uživanje duhanskog dima kasnije tijekom života nema utjecaja na metilacijski status (74,86,87,94). Istraživanja utjecaja konzumacije alkohola na globalnu DNA metilaciju nisu dovela do jasnih zaključaka, iako neki autori sugeriraju povezanost s višim vrijednostima globalne DNA metilacije, osobito u kombinaciji s uživanjem duhanskog dima (74,78,95). Indeks tjelesne mase (engl. body mass index – BMI) u većini studija nema utjecaj na DNA metilaciju, međutim u istraživanju provedenom na ženama reproduktivne dobi utvrđeno je da žene s višim BMI-om imaju snižen status globalne DNA metilacije (74,96,97). Prehrana, prvenstveno unos folata, također može utjecati na globalnu DNA metilaciju. Nedostatni unos folata uglavnom se

povezuje s nižim vrijednostima globalne DNA metilacije (98-101). Također, prehrana majke tijekom trudnoće može utjecati na metilacijski obrazac ploda (102). Izvrstan primjer kako prehrana putem epigenetičkih modifikacija može dovesti do promjene fenotipa ploda je istraživanje provedeno na mišjim Agouti modelima (102). Dokazano je da promjene u unosu donora metilnih skupina u prehrani majke miša mogu utjecati na DNA metilaciju potomaka. Ove promjene su u konačnici dovele do promjena u boji krvna potomaka, neovisno o njihovom genotipu.

1.3.2. Metabolizam folata i DNA metilacija

Folat pripada skupini B vitamina, topljivih u vodi i ima važnu ulogu u razdobljima intenzivnog staničnog rasta. Ovaj esencijalni vitamin potreban je u brojnim reakcijama metilacije. Dokazano je da deficit folata može biti uzrok DNA hipometilacije (98-101). Naime, glavni donor metilnih skupina za DNA metilaciju je S-adenozilmetionin (SAM), važan metilirajući agens koji sudjeluje u više od stotinu poznatih reakcija metilacije, uključujući metilaciju DNA, RNA, proteina i lipida (103). Prijenosom metilne skupine SAM se konvertira u S-adenozilhomocistein (SAH) koji se zatim hidrolizira u homocistein i adenosin (103). SAM se sintetizira u ciklusu aktivirane metilne skupine iz esencijalne aminokiseline metionina. Unos metionina putem prehrane nije dovoljan za brojne reakcije metilacije pa se homocistein usmjerava na put remetilacije u metionin posredovan enzimom metionin sintaza (engl. methionin sintase). Glavni izvor metilnih skupina za ovu reakciju je cirkulirajuća forma folata, 5-metiltetrahidrofolat. Nedostatak aktiviranih metilnih skupina dovodi do smanjene sinteze SAM i povećanja razine totalnog homocisteina u plazmi, što rezultira povećanjem unutarstanične razine SAH i smanjenjem omjera SAM/SAH. SAH inhibira DNA metiltransferazu te se omjer SAM/SAH smatra dobrim pokazateljem metilacijskih sposobnosti stanice (103,104). Jedini izvor folata za čovjeka je unos putem prehrane. Folate nalazimo u zelenom lisnatom povrću (špinat, salata, brokula), voću (naranče, limuni, jagode,

kivi), mahunarkama, žitaricama i telećoj jetri (105). Nakon apsorpcije u ileumu folati se reduciraju i metiliraju u jetri u cirkulirajuću formu N5-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF), a enzim koji katalizira ovu reakciju je metilentetrahidrofolat reduktaza (engl. methylenetetrahydrofolate reduktase – MTHFR). Ovaj enzim ima ključnu ulogu u regulaciji dostupnosti folata za sintezu DNA i remetilaciju homocisteina. Do danas je poznato više od 20-ak mutacija na *MTHFR* genu, a jedan od funkcionalno najvažnijih polimorfizma *MTHFR* gena je C677T koji nastaje supstitucijom baze citozina u timin u 4. egzonu što dovodi do zamjene aminokiseline alanina u valin (A222V) (106). Ovaj polimorfizam utječe na termolabilnost enzima i reducira njegovu aktivnost za 50%-60% uslijed čega se smanjuju količine dostupnog 5-metilTHF (106). Ovakav enzim je nesposoban vezati folate što znatno umanjuje prijenos metilnih skupina i može dovesti do različitih poremećaja (107). Dokazano je da u kombinaciji sa smanjenom koncentracijom folata u krvi, ovaj polimorfizam dovodi do hipometilacije DNA u leukocitima periferne krvi zdravih osoba (108-111). Istraživanja pokazuju da *MTHFR* C677T polimorfizam uz nedostatan unos folata može biti rizičan čimbenik za poremećaje povezane s DNA hipometilacijom, uključujući prirođene anomalije kao što su defekt neuralne cijevi (engl. neural tube defect – NTD), rascjep usne i nepca (engl. cleft palate) i prirođene srčane greške (engl. congenital heart defects – CHD) (112).

1.4. DNA metilacija i prirođene srčane greške

Prirođene srčane greške spadaju među najčešće prirođene anomalije s prevalencijom od 0.8% uključujući živorodenu i mrtvorodenu djecu kao i medicinski indicirane prekide trudnoća (113). Prirođene srčane greške se mogu javiti kao izolirane malformacije ili združene s drugim ekstrakardijalnim malformacijama (114,115). Nastaju uslijed nepotpunog razvoja srca tijekom embrionalnog razdoblja (116-118). Embrionalni razvoj srca započinje početkom 3. tjedna gestacije kada stanice visceralnog mezoderma u stijenci žumanjčane vreće diferenciraju u angioblaste, preteče endotelnih stanica. Proliferacijom angioblasta na

lateralnim stranama embrija nastaju dvije skupine angiogenih stanica. Ove stanice migriraju prema naprijed formirajući primarno ili prvo kardiogeno područje (engl. first heart field – FHF) koje poput polumjeseca obuhvaća prednji kraj neuralne ploče (engl. cardial crescent). Nešto kasnije, pojavljuje se još jedna skupina angiogenih stanica koja formira drugo kardiogeno područje (engl. second heart field – SHF) te se postavlja medijalno i dorzalno u odnosu na FHF u području kardiogenog polumjeseca (119). Zbog savijanja embrija u lateralnom smjeru, do kraja 3. tjedna, ove stanice se stapaju u zajedničku srčanu cijev, koja se sastoji od unutrašnjeg sloja endokardijalnih stanica i vanjskog sloja miokardijalnih stanica. Između 23. i 28. dana srčana cijev nastavlja rasti i počinje se savijati u srčanu petlju. Za vrijeme oblikovanja srčane petlje duž srčane cijevi nastaju proširenja, što rezultira nastankom četiriju srčanih šupljina. Do kraja embrionalnog razvoja formiraju se srčani zalistici i pregrađuju se atriji, ventrikuli i arterijski trunkus (120). Pravilan položaj i funkcija srčanih zalistaka ključni su za formiranje komora i pravilan protok krvi.

Etiologija CHD-a je u većini slučajeva nepoznata (121). Od poznatih uzroka genetički čimbenici su najzastupljeniji. Kromosomske abnormalnosti javljaju u 5%-10%, a genske promjene u 3%-5% slučajeva CHD-a (122). Oko 2% slučajeva CHD-a nastaje tijekom embrionalnog razvoja uslijed toksičnog djelovanja alkohola, te lijekova kao što su litij, talidomid, neki antiepileptici, kao i uslijed izloženosti majke rendgenskom zračenju (123). Infekcija virusom rubeole, šećerna bolest, fenilketonurija i sistemski eritemski lupus majke, također mogu dovesti do poremećaja normalnog razvojnog procesa srca (123). Rizik od razvoja CHD-a nakon izloženosti teratogenu ovisi o dozi, razdoblju i trajanju izloženosti, te genetičkoj predispoziciji majke i ploda. Međutim, pojedinačne uzroke u nastanku CHD vrlo je teško izdvojiti. Smatra se da 85% CHD ima multifaktorijalnu etiologiju i nastaje kao posljedica međudjelovanja gena majke i ploda kao i brojnih vanjskih čimbenika koji djeluju na razvoj srca tijekom embrionalnog razvoja (73,84,104,113,121,122,124,125). Stoga su mnoge studije usmjerene na utvrđivanje mjera prevencije u nastanku CHD-a u smislu izbjegavanja lijekova, kemijskih agenasa te imunizacije protiv specifičnih mikroorganizama (113). Predmet

brojnih istraživanja je i protektivan učinak prekoncepcijskog unosa folata na nastanak CHD-a (121,125-134). Tijekom trudnoće je povećana potreba za sintezom i metilacijom DNA koje su ovisne o folatima (135). Dokazano je da deficit folata tijekom trudnoće ili upotreba lijekova koji interferiraju s metabolizmom folata imaju teratogeni učinak, što se očituje većom učestalošću pobačaja, poremećaja razvoja i prirođenih anomalija, uključujući NTD i CHD (136,137). Još je 1991. godine Medical Research Council donio preporuke o uzimanju folne kiseline u perikoncepcijском razdoblju i tijekom prva tri mjeseca trudnoće kao mjeru prevencije za NTD (137-139). Food and Drug Administration je 1998. godine propisala obogaćivanje žitarica folnom kiselinom te se danas u velikom broju zemalja bilježi znatno smanjenje incidencije NTD-a (140-142). Protektivan učinak folata u nastanku CHD-a sugerira sve veći broj istraživanja (121,125-134). Shaw i suradnici su utvrdili da je rizik za nastanak konotrunkalnih anomalija u djeteta 30%-35% manji u majki koje su uzimale folnu kiselinu u perikoncepcijском razdoblju u odnosu na majke koje nisu uzimale folnu kiselinu (126). Ove rezultate potvrdila je i velika studija provedena u Atlanti u kojoj su majke konzumenti multivitamina s folnom kiselinom imale 24% manji rizik za nastanak CHD-a u djeteta, osobito konotrunkalnih anomalija i defekata septuma ventrikula (engl. ventricular septal defect, VSD) (121,127,134). Czeizel i suradnici su utvrdili još veću značajnost te je prenatalni unos multivitamina koji sadrže folnu kiselinu bio povezan s čak 43% manjim rizikom za CHD djeteta, također prvenstveno konotrunkalnih anomalija i VSD (130-133). U studiji provedenoj u Nizozemskoj utvrđena je povezanost povećanog unosa folne kiseline i smanjenog rizika za nastanak septalnih defekata srca (143). Važno je spomenuti i istraživanje provedeno u Kanadi, u kojem je utvrđena smanjena prevalencija CHD-a nakon uvođenja mandatornog obogaćivanja žitarica folnom kiselinom (144). Nadalje, rizik za nastanak CHD-a u djeteta je veći kod trudnica koje upotrebljavaju lijekove koji interferiraju s metabolizmom folata kao što su inhibitori dihidrofolat reduktaze (145). Ovi lijekovi sprječavaju sintezu tetrahidrofolata, aktivnog oblika folata, a koriste se u terapijske svrhe kao antibiotici i antimetaboliti. Smatra se da je protektivan učinak folata upravo u stimulaciji unutarstaničnih metilacijskih procesa te

da je nedostatak folata djelovanjem na uspostavu i održavanje metilacijskog obrasca, povezan s različitim tumorima, kardiovaskularnim, neurološkim i psihijatrijskim poremećajima te prirođenim anomalijama (116,121,125-134,143,144,146-148). Iako se radi o manjem broju istraživanja, treba spomenuti da neki autori nisu utvrdili povezanost povećanog unosa folata majke i rizika za nastanak CHD-a u djeteta (128,129).

S obzirom na brojne studije koje sugeriraju protektivan učinak folata na CHD, veliki znanstveni interes usmjeren je i na povezanosti *MTHFR* C677T polimorfizma i povišenog rizika za nastanak CHD-a (106,149-159). Međutim, rezultati istraživanja su kontradiktorni. Zadnja meta analiza iz 2012. godine uključila je 20 studija provedenih u zemljama Sjeverne i Južne Amerike, Europe i Azije (159). Utvrđeno je da *MTHFR* 677TT genotip u djece i očeva predstavlja rizični čimbenik za nastanak CHD-a. Međutim, nije utvrđena povezanost između *MTHFR* C677T polimorfizma majke i povišenog rizika za nastanak CHD-a, kao ni u predhodnoj meta analizi koju su 2007. godine proveli van Beenum i suradnici (158,159). Autori naglašavaju da je potrebno uzeti u obzir heterogenost populacija uključenih u meta analizu, tipova CHD-a, nedostatak podataka o perikoncepcijskoj primjeni folata i prehrani trudnica, kao i razlike zbog mandatornog obogaćivanja žitarica folnom kiselinom u nekim zemljama. Naime, zemlje Europske unije nemaju zajednički zakon o obaveznom obogaćivanju hrane folnom kiselinom, već se ono provodi samo u nekim zemljama (121).

Mjerenje koncentracija metabolita iz puta folata/homocisteina kao biomarkera metilacije u majki djece s prirođenim anomalijama ukazuju na DNA hipometilaciju (98,151, 160-162). Još su 1999. godine Kapusta i suradnici utvrdili da je hiperhomocistinemija majke povezana s rizikom za nastanak CHD-a u djeteta (161). Također, Hobbs i suradnici su u majki djece s CHD-om utvrdili povišene koncentracije homocisteina i SAH, te snižene koncentracije metionina, SAM i omjera SAM/SAH (151). Potvrdivši ove rezultate Chowdhury i suranici su u majki djece s izoliranim CHD proveli kvantitativno mjerenje globalne DNA metilacije u limfocitima periferne krvi (77). Status globalne DNA metilacije određen je na temelju kvantifikacije metilacije LINE-1. Utvrdili su povezanost između globalne DNA

hipometilacije majki i povišenog rizika za nastanak izoliranih CHD u djeteta, i to posebno septalnih defekata. Novija istraživanja uglavnom se temelje na klasifikaciji CHD-a prema patogenetičkom mehanizmu nastanka tijekom embrionalnog razvoja koja uključuje defekte smještaja i stvaranja srčane petlje, poremećaje migracije stanica ektomezenhima, defekte usmjerenog rasta, abnormalnosti apoptoze, defekte intrakardijalnog protoka krvi te poremećaje u izvanstaničnom matriksu (163). Izvanstanični matriks ima važnu ulogu u formiranju i položaju endokardijalnih jastučića koji su ključni za pregrađivanje atrioventrikularnog kanala te membranskog dijela pregrade između atrija i ventrikula. Stoga se poremećaji izvanstaničnog matriksa smatraju ključnim patogenetskim mehanizmom u nastanku defekata endokardijalnih jastučića kao što je kompletni atrioventrikularni kanal (163). Poremećaji izvanstaničnog matriksa imaju najveću incidenciju pridruženih ekstrakardijalnih malformacija (163). Štoviše, više od 60% slučajeva atrioventrikularnog septalnog defekta se javlja upravo u sklopu sindroma Down. U nedavnoj studiji provedenoj na tkivu srca plodova s trisomijom 21, utvrđena je promijenjena ekspresija gena izvanstaničnog matriksa (164). Tijekom embrionalnog razvoja je važno postići diferencijalnu ekspresiju gena kako bi se mogle razviti sve vrste stanica i tkiva, a nužno je i imati kontrolu nad time koji će geni i u kojim stanicama biti utišani. Svaka diferencirana stanica jednog organizma ima karakterističan epigenetički biljeg koji u konačnici dovodi do karakterističnog fenotipa. DNA hipometilacija se povezuje s promijenjenom genskom ekspresijom, diferencijacijom stanica i apoptozom u embrionalnom razvoju (19). Osim što direktno regulira transkripciju gena interferirajući s vezanjem transkripcijskih faktora, DNA metilacija predstavlja ključan epigenetički mehanizam u regulaciji organizacije kromatina kroz interakciju s drugim proteinima koji sudjeluju u modifikaciji histona (165). Novija istraživanja pokazuju da strukturalna organizacija kromatina ima značajnu ulogu u regulaciji genske aktivnosti tijekom razvoja srca (165-167). Smatra se da diferencijaciju i razvoj srca određuje združeno djelovanje epigenetičkih modifikacija uključujući DNA metilaciju, kovalentnu modifikaciju histona i tkivno specifične transkripcijske faktore (165-170).

1.5. Sindrom Down i DNA metilacija

Sindrom Down (DS) je najčešći uzrok mentalne retardacije u čovjeka, a nastaje kao posljedica trisomije 21. kromosoma (171). Klinička slika DS je dobro poznata, međutim osim tipične kraniofacijalne dismorfije i mentalne retardacije, simptoma koji su prisutni u svim slučajevima, ostala klinička obilježja javljaju se u određenom, većem ili manjem, postotku osoba s DS (172). Prirođene srčane greške jedne su od najčešćih abnormalnosti koje se javljaju u 40%-60% slučajeva DS. Najčešće su to septalni defekti, uključujući defekt septuma atrija, defekt septuma ventrikula, kompletni atrioventrikularni kanal, a nešto rijeđe tetralogija Fallot, otvoreni duktus Botalli i druge srčane malformacije (173). Uzroci različitosti kliničke slike, odnosno fenotipa osoba s DS još su uvijek nedovoljno poznati i predmet su mnogih istraživanja. Prema hipotezi genske doze (engl. gene dosage hypothesis), određene karakteristike DS fenotipa su rezultat povećane ekspresije specifičnih gena na kromosomu 21 (174). Međutim, hipoteza o genskoj homeostazi (engl. genetic homeostasis hypothesis) prepostavlja da fenotipske karakteristike nisu u potpunosti rezultat povećane ekspresije specifičnih gena nego su i odraz neravnoteže genske ekspresije nastale uslijed dodatnog genetičkog materijala (175). Tijekom razvoja, ova neravnoteža između gena na kromosomu 21 i gena smještenih drugdje u genomu može dovesti do podložnosti za utjecaje iz okoline (175-177). Tako se prepostavlja da su uz izravan učinak trisomije 21, rizični čimbenici roditelja u interakciji s genotipskom predispozicijom povezani s razvojem malformacija u samo nekih DS pojedinaca (175). Najnovija istraživanja pokazuju da fenotipskoj varijabilnosti u osoba s DS mogu doprinjeti različiti genetički i epigenetički čimbenici kao što su varijabilnost genske ekspresije, aktivnost transkripcijskih faktora kodiranih na kromosomu 21 ili drugdje u genomu, varijabilni broj ponavljajućih sekvenci (engl. copy number variation), aktivnost različitih regulacijskih RNA molekula te DNA metilacija (178). Poznato je da se geni na kromosomu 21 mogu svrstati u različite funkcionalne kategorije kao što su transkripcijski faktori, regulatori i modulatori, proteaze i njihovi inhibitori, kinaze, adhezijske molekule,

receptori, te metiltransferaze i geni koji sudjeluju u organizaciji kromatina i metabolizmu folata/homocisteina (168). Stoga, osim primarnog učinka u smislu povećane ekspresije gena na kromosomu 21, postoji i sekundarni učinak trisomije 21 na ekspresiju gena smještenih drugdje u genomu (179-181). Na kromosomu 21 je smješteno najmanje sedam gena uključenih u metabolizam folata, kao i gen za DNA metiltransferazu 3L (engl. DNA methyltransferase, DNMT3L) koji su neophodni u reakcijama metilacije. Osim toga, epigenetičke promjene su pod utjecajem vanjskih čimbenika, među kojima se neki povezuju i s nastankom CHD-a (175). Tako se pojedini tipovi CHD-a u DS-u povezuju s uživanjem duhanskog dima i nedostatnim unosom folata u perikoncepcijском razdoblju majke, kao i polimorfizmima gena koji sudjeluju u metabolizmu folata te promjenjenim koncentracijama metabolita uključenih u metabolizam folata u majki i osoba s DS-om (175,182,160). Obermann-Borst i suradnici su mjerili koncentracije biomarkera metilacije u krvi djece s CHD te su u grupi DS ispitanika utvrdili statistički značajno višu koncentraciju SAH i niži omjer SAM/SAH što ukazuje na DNA hipometilaciju (182). Isto tako, u majki djece s DS i CHD utvrđena je značajno povišena razina totalnog homocisteina i SAH te značajno manji omjer SAM/SAH u odnosu na kontrolnu skupinu (160).

U gotovo 93% slučajeva DS radi se o regularnom tipu trisomije 21 koji najčešće nastaje kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 tijekom oogeneze (90%-95%) i to posebno tijekom prve mejotičke diobe (70%-85%) (183,184). Stanični i molekularni mehanizmi odgovorni za nerazdvajanje kromosoma još su uvijek nedovoljno razjašnjeni. Starosna dob majke je već dobro poznati rizični čimbenik za trisomiju 21, pri čemu rizik za rađanje djeteta s DS-om nakon 35 godine proporcionalno raste s dobi majke (185-189). Usprkos brojnim istraživanjima, povezanost starosne dobi i nepravilnog razdvajanja kromosoma još uvijek je nedovoljno razjašnjena. Starosna dob majke utječe na nekoliko različitih procesa, uključujući starenje reproduktivnog sustava žene i promjene u funkciji jajnika, dulje trajanje mejotičkog mirovanja germinativnih stanica žene, degradaciju proteinskih struktura koje osiguravaju pravilno razdvajanje kromosoma, kao i akumulaciju

štetnih učinaka iz okoline koji djeluju na sve spomenute procese. Poznati etiološki čimbenik povezan s trisomijom 21 je i promijenjeni obrazac rekombinacije između homolognih kromosoma 21, pri čemu su za nastanak trisomije 21 ključna dva događaja (190). Prvo, u profazi prve mejotičke diobe nastaje tzv. „osjetljiv“ bivalent, odnosno homologni par kromosoma 21 bez mejotičke rekombinacije ili sa samo jednom rekombinacijom i to u telomernoj ili pericentromernoj regiji. Nakon toga dolazi do nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom prve ili druge mejotičke diobe, pri čemu se rizik povećava sa starosnom dobi majke (190-193). Nadalje, James i suradnici su prvi postavili hipotezu da DNA hipometilacija, uzrokovana promjenama u metabolizmu folata/homocisteina, može biti uzrok nerazdvajanja kromosoma 21 tijekom mejoze (194). Unatoč velikom interesu za istraživanje polimorfizama gena uključenih u metabolizam folata/homocisteina kao majčinih rizičnih čimbenika za DS, dobiveni rezultati uglavnom su kontradiktorni (194-212). Međutim, kvantitativna analiza globalne DNA metilacije u majki djece s DS još nije učinjena. S obzirom na istraživanja koja ukazuju da starosna dob i poremećaji u metabolizmu folata utječu na globalnu DNA metilaciju te da obrazac DNA metilacije utječe na obrazac rekombinacije, kao i na studije koje ukazuju na važnu ulogu globalne DNA metilacije u genomskoj stabilnosti, trisomija 21 predstavlja dobar model za utvrđivanje povezanosti globalne DNA metilacije i nepravilnog razdvajanja kromosoma. Osim toga, globalna DNA hipometilacija se povezuje i s razvojem CHD-a i to posebno septalnih defekata. S obzirom da se u osoba s DS-om najčešće javljaju CHD koje imaju zajednički patogenetički mehanizam nastanka, te da se uglavnom radi o septalnim defektima, trisomija 21 također predstavlja dobar model za utvrđivanje povezanosti globalne DNA hipometilacije i razvoja prirođenih srčanih grešaka.

2. Cilj istraživanja

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanosti globalne DNA metilacije i nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 tijekom oogeneze i razvoja sindromskog CHD.

Pretpostavke ovog istraživanja bile su sljedeće:

1. Globalna DNA metilacija u majki djece s trisomijom 21 regularnog tipa majčinog podrijetla je promijenjena u odnosu na globalnu DNA metilaciju majki zdrave djece,
2. Globalna metilacija DNA u majki djece s DS-om i CHD-om (DS-CHD⁺) je promijenjena u odnosu na globalnu metilaciju majki djece s DS-om bez CHD-a (DS-CHD⁻),
3. Globalna metilacija DNA u osoba s DS-CHD⁺ je promijenjena u odnosu na globalnu metilaciju osoba s DS-CHD⁻.

Specifični ciljevi rada bili su sljedeći:

1. odrediti globalnu DNA metilaciju u majki djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla i u majki zdrave djece,
2. ispitati povezanost globalne DNA metilacije u majki djece s DS-om i diobe u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 (mejoza I i II oogeneze),
3. ispitati utjecaj vanjskih čimbenika kao što su starosna dob majke, indeks tjelesne mase, uživanje duhanskog dima, konzumiranje alkohola i unos folata na globalnu DNA metilaciju u majki djece s DS-om i u majki zdrave djece,
4. ispitati povezanost MTHFR C677T polimorfizma i globalne DNA metilacije u majki djece s DS-om i u majki zdrave djece,
5. ispitati povezanost globalne DNA metilacije majki i prisustva CHD-a u djece s DS-om s posebnim osvrtom na vanjske čimbenike koji utječu na globalnu metilaciju,
6. ispitati povezanost globalne DNA metilacije u djece s DS-om i prisustva CHD-a s posebnim osvrtom na vanjske čimbenike koji utječu na globalnu metilaciju,

3. Ispitanici i metode

3.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 94 majki djece s trisomijom 21 regularnog tipa majčinog podrijetla. Roditeljsko podrijetlo trisomije 21 bilo je utvrđeno na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. U istraživanju su sudjelovale i 42 osobe s DS-om, a koje su djeca majki uključenih u ovo istraživanje. Uzorci svih ispitanika su bili pohranjeni u DNA banchi na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, na -20°C. Sve majke djece s DS-om koje su uključene u istraživanje ponovno su kontaktirane i dale su pristanak za sudjelovanje u ovom istraživanju kao i suglasnost za korištenje pohranjene krvi i DNA uzorka njenog djeteta. Tom prilikom majke su odgovarale i na pitanja iz anketnog upitnika.

U kontrolnu grupu je bilo uključeno 100 majki zdrave djece i uredne obiteljske i osobne anamneze. Kontrolna grupa odabrana je među suradnicama, prijateljicama i poznanicama koje su odgovarale kriterijima istraživanja i koje su nakon detaljnog objašnjenja svrhe i metodologije ovog istraživanja dale svoj informirani pristanak. Ispitivana i kontrolna grupa su usklađene s obzirom na starosnu dob.

Istraživanje je izrađeno na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska i u Laboratoriju za radiobiologiju i molekularnu genetiku na Institutu za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA je izolirana iz periferne krvi (3 – 5 ml) dobivene venepunkcijom. Izolacija je izvedena pomoću FlexiGene DNA Kita (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) prema protokolu koji navodi proizvođač. Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA određena je spektrofotometrom prema uputama proizvođača (BioMateTM3, Thermo electron corporation,

SAD). Do analize uzorci DNA bili su pohranjeni na -20°C na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

3.2.2. Genotipizacija *MTHFR C677T* polimorfizma

Genotipizacija *MTHFR C677T* polimorfizma utvrđivala se metodom lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase chain reaction – PCR), nakon koje je slijedila restrikcija s odgovarajućom restriktivnom endonukleazom (engl. Restriction fragment length polymorphism – RFLP), prema već opisanom protokolu (202). Umnožavanje ciljnog fragmenta genomske DNA molekule odvijalo se u volumenu od 25 µl u uređaju za PCR (engl. thermocycler) (Eppendorf). Slijed početnih oligonukleotida za umnažanje ciljnog fragmenta genomske DNA u postupku genotipizacije *MTHFR C677T* i sadržaj PCR reakcijske smjese prikazani su u tablici 1. Primjenjeni su sljedeći uvjeti PCR reakcije: 94 °C/2 minute → 40 ciklusa: 94 °C/30 sekundi, 62 °C/30 sekundi, 72 °C/30 sekundi → 72 °C/7 minuta. Amplificirani produkti razdvojeni su elektroforezom (30 min/80V) na 1% agaroznom gelu u koji je dodano 0,1 mg/ml etidium bromida, a veličina PCR produkta određivala se primjenom DNA standarda od 100 pb. Vizualizacija rezultata vršila se pod UV-svetlom transiluminatora. Nakon PCR reakcije slijedila je restrikcija PCR produkata s Hinf I restriktivnom endonukleazom i pripadajućim puferima (Hinf I/0.1 + pufer 1X React2). Restriktivni fragmenti razdvojeni su elektroforezom (30 – 45 min/ 80V) na 3% agaroznom gelu u koji je dodano 0,1 mg/ml etidium bromida, a veličina im se odredila primjenom DNA standarda od 25 i 100 pb. Veličina PCR produkta i restriktivnih fragmenata prikazana je u tablici 2.

Tablica 1. Sekvence početnih oligonukleotida i PCR reakcijska smjesa za analizu *MTHFR* C677T polimorfizma

Sekvence početnih oligonukleotida za <i>MTHFR</i> C677T	
Oznaka početnice	Slijed početnice
<i>MTHFR</i> C677T – F	5’TGAAGGAGAAGGTGTCTGCAGGA3’
<i>MTHFR</i> C677T – R	5’AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3’
PCR reakcijska smjesa (V = 25 µl)	
Sadržaj reakcijske smjesa	<i>MTHFR</i> C677T Konačna koncentracija
10 x PCR pufer	1 X
50 mM MgCl ₂	2,5 mM
10 mM dNTP	0,2 mM
10 x početnica	20 pmol
10 x početnica	20 pmol
<i>Taq</i> polimeraza	1,25 U
DNA	100 ng DNA
bidestilirana voda	

Tablica 2. Veličina PCR produkta i određivanje genotipova za *MTHFR* C677T polimorfizam na temelju veličine restriktivskih fragmenata

Genotip	PCR produkt (bp)	Restriktivski fragment (bp)
<i>MTHFR</i> 677CC		198
<i>MTHFR</i> 677CT	198	198, 175, 23
<i>MTHFR</i> 677TT		175, 23

3.2.3. Bisulfitna konverzija

Bisulfitna konverzija DNA uzoraka koja podrazumijeva konverziju nemetiliranog citozina u uracil, dok metilirani citozin ostaje nepromijenjen, provodila se pomoću EpiTec Bisulfite Kita (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka) prema protokolima koje navodi proizvođač. Za reakciju bisulfitne konverzije koristilo se 500 ng genomske DNA, a konvertirana DNA je ponovno otopljena u 30 µl TE pufera. Bisulfitno modificirani uzorci su, do analize, bili pohranjeni na -20°C na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

3.2.4. Utvrđivanje globalne DNA metilacije MethyLight metodom

MethyLight je kvantitativna PCR metoda u stvarnom vremenu (engl. real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR), visoke protočnosti (eng. high-throughput) i visoke specifičnosti za detekciju sekvenci koje podliježu metilaciji. Bisulfitna modifikacija stvara razlike u DNA ovisno o prisutnosti metilacije. Upravo te razlike se detektiraju MethyLight metodom, nakon amplifikacije modificirane DNA, vezivanjem specifičnih fluorescentno obilježenih proba za mesta na DNA koja podliježu metilaciji. Globalna DNA metilacija određena je kvantifikacijom LINE-1 metilacije pomoću modificirane MethyLight metode koja se temeljila na opisanim protokolima (14,77,213,214). Za real-time PCR reakciju korišteni su TaqMan Universal Master Mix reagensi, uz specifične početnice za LINE-1 sekvence koje su omogućavale umnažanje ciljnog fragmenta neovisno o prisutnosti metilacije i dvije TaqMan MGB probe specifične za metilirane i nemetilirane sekvence u okviru LINE-1, dizajnirane za bisulfitno modificiranu DNA (Applied Biosystems, Forest City, CA, USA). Normalizacija unosa DNA provedena je pomoću Real-time PCR reakcije s početnicama i TaqMan probama za Alu sekvence (ALU-C4), (Applied Biosystems, Forest City, CA, USA) (14). ALU-C4 spada u ponavljajuće elemente, a ne sadrži CpG dinukleotide, te omogućava umnažanje ciljnog fragmenta neovisno o metilaciji. Slijed početnih oligonukleotida za umnažanje LINE-1 (GeneBank Accession Number X58 075) i ALU-C4 fragmenta i proba u postupku određivanja metilacije i sadržaj Real-time PCR reakcijske smjese prikazani su u tablici 3. Reakcije PCR

odvijale su se u volumenu od 25 μ l na pločicama za ABI 7500 Real-time PCR aparat (Applied Biosystems, Forest City, CA, USA), a analiza se izvodila pomoću SDS programa 1.4.0 (Applied Biosystems, Forest City, CA, USA). Kvantifikacija metilacije LINE-1 određena je metodama apsolutne i relativne kvantifikacije pomoću standardne krivulje (14,77,213,214). Standardna krivulja je konstruirana pomoću serijskih razrijeđenja metilirane i nemetilirane DNA, poznate koncentracije, iz EpiTect PCR Control DNA set-a prema uputama proizvođača (QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka). Bisulfitno modificirana DNA uzorka i serijska razrijeđenja metilirane i nemetilirane DNA za izradu standardne krivulje razrijeđena su 10x. Za svaki istraživani uzorak Real-time PCR je napravljen u duplikatu. Ovom metodom se mogu detektirati samo potpuno metilirane i potpuno nemetilirane LINE-1 sekvene, dok se parcijalna metilacija LINE-1 ne može detektirati.

Tablica 3. Slijed početnih oligonukleotida i proba za LINE-1 i ALU-C4

Oznaka početnice	Slijed početnice
Line-1 F	5'TTATTAGGGAGTGTTAGATAGTGGG3'
Line-1 R	5'CCTCTAACCAAATATAAAAT ATAATCTC3';
ALU-C4 F	5'GGTTAGGTATAGTGGTTATATTGTAATTTAGTA3'
ALU-C4 R	5'ATTAACTAACAACTTAAACTCCTAACCTCA3'
Oznaka probe	Slijed probe
Line-1 met	VIC-TACTTCGACTCGCGCACGATA-MBG3'
Line-1 unmet	6FAM-CCTACTTCAACTCACACA-MBG3'
ALU-C4	6FAM-CCTACCTAACCTCCC-MGB3'

3.2.4.1. Računanje postotka metilacije

U metodi relativne kvantifikacije, količine metilirane i nemetilirane DNA utvrđene su pomoću standardne krivulje, te su normalizirane s obzirom na unos DNA pomoću ALU-C4 real-time PCR reakcije, prema opisanom protokolu (14). Postotak metilacije izračunat je iz odnosa između vrijednosti dobivenih u reakcijama s LINE-1 početnicama (LINE-1) i vrijednosti dobivenih u reakcijama s ALU-C4 početnicama (ALU-C4) (14,213,215). Postotak metilirane DNA uzorka u odnosu na referentnu DNA (engl. percentage of methylated reference, PMR) i postotak nemetilirane DNA uzorka u odnosu na referentnu DNA (engl. percentage of unmethylated reference, PUR) izračunati su prema formulama:

LINE-1 (uzorak):ALU-C4(uzorak)

$$\text{PMR} = \frac{\text{LINE1 (100% metilirane DNA)} : \text{ALU-C4 (100% metilirane DNA)}}{\text{LINE1 (100% metilirane DNA)} : \text{ALU-C4 (100% metilirane DNA)}} \times 100$$

LINE-1 (uzorak):ALU-C4(uzorak)

$$\text{PUR} = \frac{\text{LINE1 (0% metilirane DNA)} : \text{ALU-C4 (0% metilirane DNA)}}{\text{LINE1 (0% metilirane DNA)} : \text{ALU-C4 (0% metilirane DNA)}} \times 100$$

U metodi apsolutne kvantifikacije postotka globalne DNA metilacije količine metilirane (M) i nemetilirane (nM) DNA utvrđene su pomoću standardne krivulje. Postotak globalne DNA metilacije bio je izračunat prema formuli $M/(M+nM) \times 100$ (77).

S obzirom da su PMR i PUR vrijednosti normalizirane u odnosu na unos DNA pomoću ALU-C4, u ovom radu je postotak globalne DNA metilacije izračunat prema formuli za apsolutnu kvantifikaciju, pri čemu je umjesto M u formulu uvršen PMR, a umjesto nM je u formulu uvršten PUR. Konačna formula za globalnu DNA metilaciju je bila $\text{PMR}/(\text{PMR}+\text{PUR}) \times 100$.

3.2.5. Anketni upitnik

Za prikupljanje demografskih i kliničkih podataka te prehrambenih navika majke koristio se posebno kreiran upitnik (prilog 1). Upitnik, osim demografskih podataka, sadrži i podatke o težini i visini potrebnih za izračun indeksa tjelesne mase, podatke o uživanju duhanskog dima, konzumiranju alkohola, unosu pripravaka folne kiseline i prehrambenim navikama majke.

Etički aspekti istraživanja

U ovom istraživanju osigurano je poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa kao što su osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost, u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Medicinski podaci i humani materijal prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim principima, te su osigurani privatnost (medicinska tajna) ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

3.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je uz pomoć računalnih programa Statistika for Windows, inačica (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) i MedCalc (Copyrights 12.4.0. 1993-2012). Za izračunavanje očekivane frekvencije homozigota i heterozigota za ispitivani polimorfizam koristila se Hardy-Weinbergova jednadžba: $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$, gdje p predstavlja frekvenciju alela divljeg tipa, a q frekvenciju mutiranog alela. Razlike u učestalosti alela i genotipova MTHFR C677T polimorfizma te moguća odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže testirani su χ^2 -testom i Fisher-ovim testom. Razlike u učestalosti unosa pripravaka folata, namirnica bogatih folatima, uživanja duhanskog dima, konzumacije alkohola i korištenja lijekova između ispitanika i kontrolne skupine određivale su se χ^2 -testom i Fisher-ovim testom. Razlike u starosnoj dobi i indeksu tjelesne mase između ispitanika određene su Mann-Whitney-evim testom, kao i razlika u postotku globalne DNA metilacije između majki

djece s DS-om i kontrolne skupine. Stupnjevitom regresijskom analizom (engl. stepwise regression analysis) ispitivala se povezanost između globalne DNA metilacije i uživanja duhanskog dima, konzumacije alkohola, lijekova, starosne dobi, BMI, unosa pripravaka folata, namirnica bogatih folatima, *MTHFR* C677T polimorfizma, kao i kombinacija genotipa *MTHFR* C677T polimorfizma i unosa namirnica bogatih folatima. Stupnjevita regresijska analiza omogućila je otkrivanje onih nezavisnih varijabli koje su statistički značajno korelirale s metilacijom LINE-1. Multipli koeficijent determinacije R^2 je pokazao koliki je udio promjena vrijednosti globalne DNA metilacije objašnjen (uzrokovani) promjenama u nezavisnih varijabli. Kao ulazni kriterij značajnosti koeficijenta korelacije za nezavisnu varijablu korištena je vrijednost faktora $F=4$, dok je kao izlazni kriterij korištena vrijednost $F=1$. Statistički značajne razlike u svim analizama su potvrđene na razini $P<0,05$. Učinak unosa namirnica bogatih folatima, *MTHFR* C677T genotipa, kao i kombinacije učestalosti unosa namirnica bogatih folatima i *MTHFR* C677T polimorfizma na globalnu DNA metilaciju utvrđivale su se Kruskal-Wallis-ovim ANOVA testom. Razlike u globalnoj DNA metilaciji između majki djece s DS-CHD⁺, majki djece s DS-CHD⁻ i kontrolne grupe majki analizirane su Kruskal-Wallis-ovim ANOVA testom. Primjenom Mann-Whitney-evog testa utvrđene su razlike u globalnoj DNA metilaciji između majki kod kojih se nerazdvajanje kromosoma dogodilo tijekom mejoze I (MI majke) i majki kod kojih se nerazdvajanje kromosoma dogodilo tijekom mejoze II (MII majki), kao i između kontrolne grupe i MI majki, odnosno MII majki.

4. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 94 majki djece s DS-om, odnosno trisomijom 21 regularnog tipa majčinog podrijetla i 100 majki zdrave djece. Osim podatka o starosnoj dobi, za 4,3% (N=4) majki kontrolne grupe i 6% (N=6) majki djece s DS-om, do ostalih općih podataka nije bilo moguće doći. U tablici 4 prikazani su opći podatci ispitivane i kontrolne grupe. Starosna dob majki ispitivane i kontrolne grupe nije se statistički značajno razlikovala ($P>0,05$). Majke djece s DS-om su imale statistički značajno viši BMI u odnosu na majke zdrave djece ($P<0,05$). Učestalost prehrane bogate folatima je bila statistički značajno niža u majki djece s DS-om nego u majki zdrave djece ($P<0,05$). Prehrana bogata folatima podrazumijevala je da su majke konzumirale barem tri namirnice bogate folatima (salate, zeleno lisnato povrće, mahunarke, teleća jetra, voće, corn flakes, müesle) i to najmanje 2 do 3 puta tjedno, dok je prehrana siromašna folatima uključivala svaki manji unos od navedenog. Majke djece s DS-om su češće uživale duhanski dim do 6. tjedna trudnoće od majki kontrolne grupe ($P<0,05$). Uživanje duhanskog dima je podrazumijevalo svakodnevno uživanje kroz određeno razdoblje (prije trudnoće, prije i tijekom trudnoće, u trenutku anketiranja). Statistički značajna razlika nije utvrđena za konzumaciju alkohola i uzimanje lijekova, kako do 6. tjedna trudnoće, tako ni u vrijeme uzorkovanja ($P>0,05$) (tablica 4). Majke su se izjašnjavale da uopće nisu konzumirale alkohol ili su ga konzumirale samo u određenim prigodama. Smatralo se da su majke koristile lijekove ukoliko su svakodnevno kroz duže vrijeme uzimale neke od sljedećih grupa lijekova: antihipertenzive, antidijabetike, antiepileptike, anksiolitike, antidepressive, antibiotike, hormone štitnjače i spolne hormone.

Majke zdrave djece su statistički značajno češće konzumirale pripravke folne kiseline u trudnoći nego majke djece s DS-om ($P<0,05$) (tablica 5). U obje grupe, majke su uglavnom konzumirale pripravake folne kiseline u razdoblju od 6. do 8. tjedna trudnoće, obično nakon prvog dolaska ginekologu, pa nadalje. Razlika u učestalosti perikoncepcijске primjene folne kiseline koja podrazumijeva razdoblje od 4. tjedna prije trudnoće pa do 8. tjedna gestacije, nije bila statistički značajna ($P>0,05$).

Tablica 4. Opći podatci majki djece s DS-om (N=94) i majki zdrave djece (N=100)

	Ispitanice	Kontrola	P
Starosna dob (godine) Medijan [raspon]	39,5 [18 - 64]	39 [23 - 65]	0,942
Stručna spremna N ⁺ (%)			
Niska stručna spremna	3 (3)	1 (1)	0,294
Srednja stručna spremna	57 (63)	26 (28)	0,000
Viša i visoka stručna spremna	30 (34)	67 (71)	0,000
BMI ⁺ Medijan [raspon]	25,01 [17,19 – 39,68]	23,48 (18,07 – 34,60)	0,007
Prehrana N ⁺ (%)			
Bogata folatima	37 (41)	66 (70)	0,000
Siromašna folatima	53 (59)	28 (30)	
Uživanje duhanskog dima do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)			
Ne	43 (48)	60 (64)	0,041
Da	47 (52)	34 (36)	
Uživanje duhanskog dima u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)			
Ne	60 (67)	62 (66)	0,957
Da	30 (33)	32 (34)	
Konzumiranje alkohola do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)			
Ne	64 (71)	73 (78)	0,396
Da	26 (29)	21 (22)	
Konzumiranje alkohola u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)			
Ne	69 (77)	78 (83)	0,188
Da	21 (23)	16 (17)	
Korištenje lijekova do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)			
Ne	77 (86)	81 (86)	0,536
Da	13 (14)	13 (14)	
Korištenje lijekova u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)			
Ne	85 (94)	83 (88)	0,111
Da	5 (6)	11 (12)	

* majke djece s DS-om (N=90); kontrola (N=94);

Tablica 5. Učestalost unosa pripravaka folne kiseline u majki djece s DS-om i majki zdrave djece

	Ispitanice N=90	Kontrola N=94	OR (95%CI)	P
Unos pripravaka folne kiseline N (%)				
Ne	58 (64)	44 (47)	2,06 (1,14 – 3,72)	0,017
Da	32 (36)	50 (53)		
Perikoncepcijska primjena N (%)				
Ne	87 (97)	86 (91)	2,70 (0,69 – 10,51)	0,153
Da	3 (3)	8 (9)		
Primjena od 6. tjedna trudnoće N (%)				
Ne	59 (66)	45 (48)	2,07 (1,14 – 3,75)	0,016
Da	31 (34)	49 (52)		

4.1. Učestalost *MTHFR C677T* polimorfizma u majki djece s DS-om

U tablici 6 prikazana je učestalost genotipova i alela *MTHFR C677T* polimorfizma u majki djece s DS-om i majki kontrolne grupe. Distribucija *MTHFR C677T* genotipova bila je u skladu s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u skupini majki djece s DS-om ($P=0,944$) i u kontrolnoj skupini ($P=1,000$). Učestalost pojedinih genotipova i alela *MTHFR C677T* polimorfizma nije se statistički značajno razlikovala između ispitanica i kontrolne grupe ($P>0,05$).

Tablica 6. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u majki djece s DS-om i majki zdrave djece

<i>MTHFR</i> C677T	Ispitanice* N (%)	Kontrola** N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
CC	46 (49)	49 (49)	Referentni genotip	
CT	38 (40)	42 (42)	1,04 (0,57 – 1,88)	0,903
TT	10 (11)	9 (9)	0,84 (0,32 – 2,27)	0,738
CT+TT	48 (51)	51 (51)	1,00 (0,57 – 1,75)	0,993
Alel				
C	130 (69)	140 (70)	Referentni alel	
T	58 (31)	60 (30)	0,96 (0,62 – 1,48)	0,856

*N=94; **N=100

4.2. Globalna DNA metilacija

U tablici 8 su prikazane PMR i PUR vrijednosti te vrijednost odnosno postotak globalne DNA metilacije u ispitivanoj i kontrolnoj grupi. U majki djece s DS-om su utvrđene statistički značajno više PMR i PUR vrijednosti i statistički značajno niža vrijednost globalne DNA metilacije u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika ($P<0,001$). Reprezentativne krivulje amplifikacije metiliranih i nemetiliranih LINE-1 sekvenci kao i amplifikacije ALU-C4 sekvenci cjelokupnog genoma ispitanika prikazane su u prilogu 2 i 3.

Tablica 8. Vrijednosti DNA metilacije u majki djece s DS i majki zdrave djece

	Ispitanice N=94	Kontrola N=100	P
PMR (%) Median [raspon]	76,06 [29,05 – 118,72]	65,71 [17,97 – 95,24]	0,0002
PUR (%) Median [raspon]	3,41 [0,05 – 19,62]	1,36 [0,08 – 10,20]	0,0000
Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]	95,45 [79,13 – 99,90]	97,99 [88,61 -99,78]	0,0000

PMR - postotak metilirane DNA uzorka u odnosu na referentnu DNA;

PUR - postotak metilirane DNA uzorka u odnosu na referentnu DNA

4.3. Utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika na globalnu DNA metilaciju

Utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika kao prediktora za globalnu DNA metilaciju analiziran je pomoću stupnjevite multiple regresijske analize i to prvo, u svih majki zajedno, bez obzira na pripadnost pojedinoj grupi (ispitanice+kontrola; N=184), a zatim i zasebno u grupi ispitanica, odnosno kontrolnoj grupi.

Za analizu svih majki zajedno, kao nezavisne varijable uključene su: pripadnost pojedinoj grupi (ispitanice/kontrola), starosna dob, BMI, *MTHFR* C677T genotip, unos folata prehranom, uživanje duhanskog dima i konzumacija alkohola u vrijeme uzorkovanja te korištenje lijekova u vrijeme uzorkovanja i terapijska skupina kojoj lijek pripada. U analizu je uključena i nova nezavisna varijabla, dobna skupina, koja je definirala mlađe (≤ 35 godina) i starije (> 35 godina) majke. Starosna dob od 35 godina je određena kao dobna granica između starijih i mlađih majki s obzirom da je ova dob već dobro poznati rizični čimbenik za trisomiju 21 (185-189). Varijabla pripadnost grupi (ispitanice/kontrola) je statistički značajno utjecala na vrijednosti globalne DNA metilacije, s udjelom od 10,2% (tablica 9). Pozitivna β vrijednost ukazuje da postoji statistički značajna vjerojatnost da majke djece s DS-om imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije od kontrolne grupe majki, što je u skladu s rezultatima prikazanim u tablici 8. Negativna β vrijednost za *MTHFR* C677T polimorfizam pokazuje da je CC genotip statistički značajno povezan s višim vrijednostima, a TT genotip s nižim vrijednostima globalne DNA metilacije. Negativna β vrijednost za dobnu skupinu pokazuje da postoji statistički značajna vjerojatnost da starije majke imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na mlađe. Pozitivna β vrijednost za varijablu prehrana pokazuje da postoji statistički značajna povezanost između prehrane bogate folatima i viših vrijednosti globalne DNA metilacije.

Tablica 9. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za globalnu DNA metilaciju u svih majki (ispitanice i kontrola)

Sve majke (ispitanici i kontrola) (N=184)					
Zavisna varijabla	Nezavisne varijable	β	r	Promjena multiplog R ²	P
Globalna DNA metilacija	Pripadnost grupi ispitanice/kontrola	0,259	0,261	0,102	0,000
	Genotip <i>MTHFR</i> C677T	- 0,145	- 0,156	0,021	0,039
	Dobna skupina	-0,164	-0,175	0,021	0,038
	Prehrana	0,159	0,163	0,023	0,028

Kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=4, F za izlazak=1.

β – koeficijent korelacije nezavisne varijable sa zavisnom; r – parcijalna korelacija nezavisne varijable sa zavisnom

U tablici 10 prikazane su vrijednosti globalne DNA metilacije u svih majki zajedno ovisno o *MTHFR* C677T genotipu.

Tablica 10. Globalna DNA metilacija u svih majki ispitanica ovisno o *MTHFR* C677T genotipu

Sve majke (ispitanice i kontrola) (N=194)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>MTHFR</i> C677T genotip		
CC	95 (49)	97,32 [88,61 - 99,78]
CT	80 (41)	97,08 [79,13 - 99,90]
TT	19 (10)	95,71 [89,44 - 99,73]
CT+TT	99 (51)	96,46 [79,13 - 99,90]

Kruskal-Wallis P=0,089

Vrijednosti globalne DNA metilacije u starijih majki (>35 godina) su bile statistički značajno niže nego u mlađih majki (≤35 godina) (P<0,05) (tablica 11).

Tablica 11. Globalna DNA metilacija u svih majki ispitanica ovisno o dobnoj skupini

Sve majke (ispitanice i kontrola) (N=194)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]	P
Dobna skupina			
≤ 35 godina	61 (31)	97,81 [90,56 - 99,78]	0,016
> 35 godina	133 (69)	96,60 [79,13 - 99,90]	

Vrijednosti globalne DNA metilacije u majki koje su imale prehranu bogatu folatima su bile statistički značajno više nego u majki koje su imale prehranu siromašnu folatima ($P<0,05$) (tablica 12).

Tablica 12. Globalna DNA metilacija u svih majki ovisno o unosu folata prehranom

Sve majke (ispitanice i kontrola) (N=194)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]	P
Prehrana			
Bogata folatima	103	97,54 [89,21 - 99,90]	0,007
Siromašna folatima	81	96,18 [79,13 - 99,78]	

U stupnjevitu multiplu regresijsku analizu za globalnu DNA metilaciju uključena je i nova nezavisna varijabla, određena kao kombinacija pojedinog *MTHFR* C677T genotipa i unosa folata prehranom (*MTHFR* C677T genotip/prehrana), dok su druge nezavisne varijable ostale iste kao u prethodnoj analizi. Osim već utvrđenog prediktora pripadnosti grupi ispitanice/kontrola, utvrđeno je da su varijable *MTHFR* C677T genotip/prehrana i dobna skupina statistički značajno utjecale na vrijednosti globalne DNA metilacije. Varijabla *MTHFR* C677T genotip/prehrana je određivala 3,2%, a dobna skupina 2,6% promjena vrijednosti globalne DNA metilacije ($P<0,05$) (Tablica 13). Pozitivna β vrijednost za varijablu *MTHFR* C677T genotip/prehrana pokazuje da je CC genotip u kombinaciji s prehranom bogatom folatima statistički značajno povezan s višim vrijednostima globalne DNA metilacije.

Tablica 13. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za globalnu DNA metilaciju u svih majki (ispitanice i kontrola)

Sve majke (ispitanice i kontrola) (N=184)					
Zavisna varijabla	Nezavisne varijable	β	r	Promjena multiplog R ²	P
Globalna DNA metilacija	Pripadnost grupi ispitanice/kontrola	0,256	0,259	0,102	0,000
	MTHFR C677T genotip/prehrana	0,207	0,212	0,032	0,011
	Dobna skupina	-0,164	-0,175	0,026	0,018

Kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=4, F za izlazak=1

β – koeficijent korelacije nezavisne varijable sa zavisnom; r – parcijalna korelacija nezavisne varijable sa zavisnom

Vrijednosti globalne DNA metilacije u svih majki zajedno u ovisnosti o kombinaciji MTHFR C677T genotip/prehrana prikazane su u tablici 14. Utvrđen je statistički značajan učinak ove kombinacije na globalnu DNA metilaciju ($P=0,024$). Kruskal–Wallis ANOVA test pokazao je da statistički značajna razlika u globalnoj DNA metilaciji postoji jedino između majki CT+TT genotipa koje su imale prehranu siromašnu folatima i majki CC genotipa koje su imale prehranu bogatu folatima ($P=0,031$).

Tablica 14. Globalna DNA metilacija u svih majki ispitanica u ovisnosti o kombinaciji MTHFR C677T genotip/prehrana

Sve majke (ispitanice i kontrola) (N=184)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
MTHFR C677T genotip/prehrana		
CC/prehrana bogata folatima*	53 (29)	97,85 [89,21 – 99,75]
CT+TT/prehrana bogata folatima	50 (27)	96,96 [89,98 – 99,90]
CC/prehrana siromašna folatima	35 (19)	96,53 [88,61 – 99,78]
CT+TT/prehrana siromašna folatima*	45 (25)	95,94 [79,13 – 99,77]

Kruskal-Wallis $P=0,031$

Stupnjevita multipla regresijska analiza za globalnu DNA metilaciju provedena je i zasebno u majki djece s DS-om i u kontrolnoj grupi majki (tablica 15). U analizi majki djece s DS-om kao nezavisne varijable uključene su starosna dob, dobna skupina, BMI, *MTHFR* C677T genotip, unos namirnica bogatih folatima, uživanje duhanskog dima u vrijeme uzorkovanja, konzumacija alkohola u vrijeme uzorkovanja, korištenje lijekova u vrijeme uzorkovanja. Nije utvrđen niti jedan statistički značajan prediktor globalne DNA metilacije ($P>0,05$). Međutim, nakon što je u analizu dodana i nezavisna varijabla *MTHFR* C677T genotip/prehrana, utvrđeno je da upravo ova varijabla jedina statistički značajno utječe na variabilnost globalne DNA metilacije, s udjelom od 4,5% ($P<0,05$) (tablica 15).

U analizu za globalnu DNA metilaciju provedenu u kontrolnoj grupi ispitanica uključene su iste nezavisne varijable kao i u analizu provedenim na majkama djece s DS-om. Jedini statistički značajan prediktor bila je varijabla dobna skupina. Utvrđeno je da ova varijabla određuje 6,2% variabilnosti globalne DNA metilacije ($P<0,05$) (tablica 15).

Tablica 15. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za globalnu DNA metilaciju u majki djece s DS-om i u majki zdrave djece

Majke djece s DS-om (N=90)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	β	r	Promjena multiplog R^2	P
Globalna DNA metilacija	MTHFR C677T genotip/prehrana	0,588	0,211	0,045	0,046
Majke zdrave djece (N=94)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	β	r	Promjena multiplog R^2	P
Globalna DNA metilacija	Dobna skupina	-0,248	-0,248	0,062	0,016

Kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=4, F za izlazak=1

β – koeficijent korelacije nezavisne varijable sa zavisnom; r – parcijalna korelacija nezavisne varijable sa zavisnom

Vrijednosti globalne DNA metilacije u majki djece s DS-om u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana prikazane su u tablici 16.

Tablica 16. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana

Majke djece s DS-om (N=90)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>MTHFR</i> C677T genotip/prehrana		
CC/prehrana bogata folatima	21 (23)	96,42 [90,70 - 99,73]
CT+TT/prehrana bogata folatima	16 (18)	94,72 [90,56 - 99,90]
CC/prehrana siromašna folatima	22 (25)	95,09 [91,36 - 98,95]
CT+TT/prehrana siromašna folatima	31 (34)	94,30 [79,13 - 99,48]

Kruskal-Wallis P=0,383

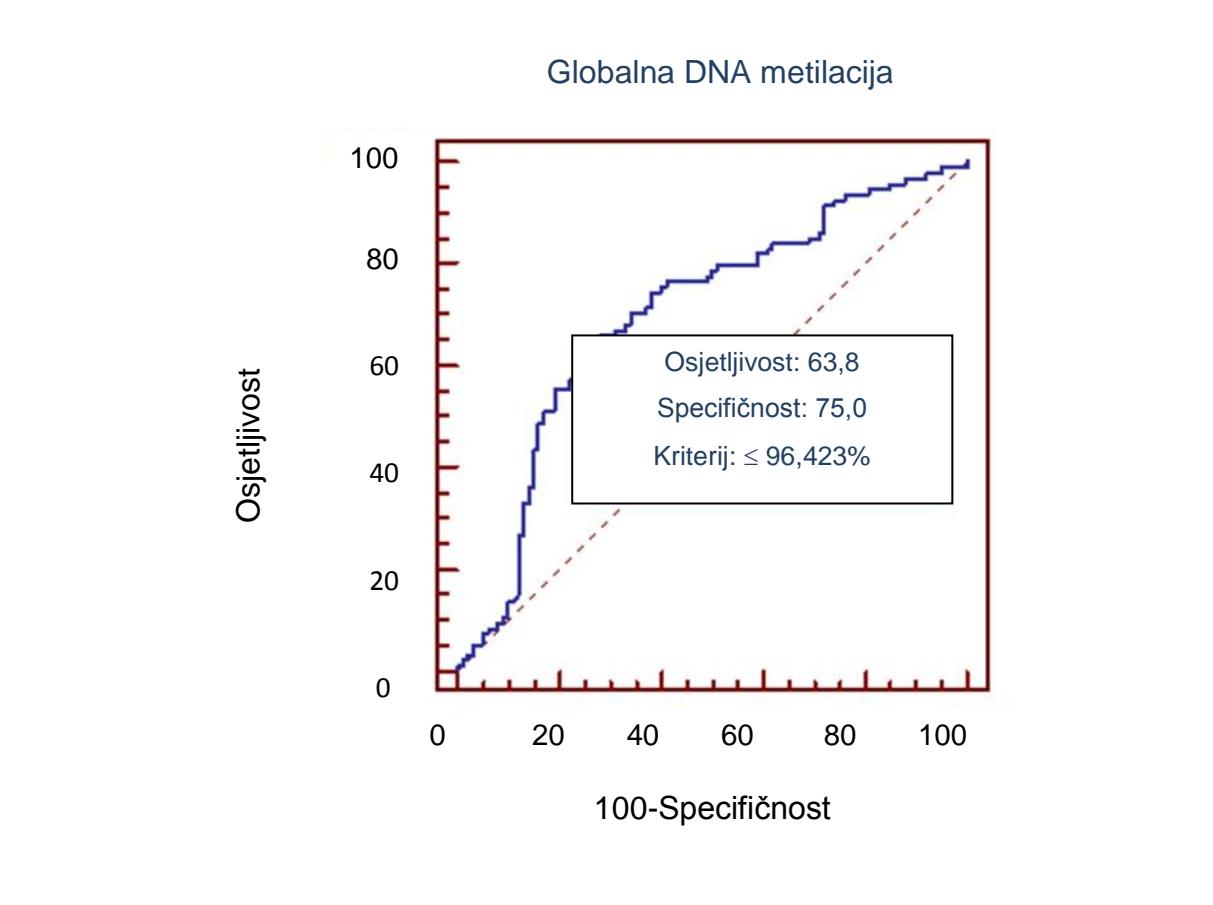
U tablici 17 prikazane su vrijednosti globalne DNA metilacije u kontrolnoj grupi majki ovisno o dobnoj skupini. Starija grupa majki je imala statistički značajno niže vrijednosti globalne DNA metilacije (P=0,003).

Tablica 17. Globalna DNA metilacija u kontrolnoj grupi majki ovisno o dobnoj skupini

Kontrola (N=100)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]	P
Dobna skupina			
≤ 35 godina	34 (34)	98,82 [90,85 - 99,78]	0,003
> 35 godina	66 (66)	97,74 [88,61 - 99,75]	

4.4. Utvrđivanje kriterijske vrijednosti globalne DNA metilacije kao prediktora za trisomiju 21

Primjenom ROC (engl. Receiver Operating Characteristic) metode utvrđena je vrijednost globalne DNA metilacije $\leq 96,42\%$ kao kriterijska vrijednost koja s najvećom preciznošću razlikuje majke koje su imale dijete s DS-om od onih koje nisu ($P=0,000$) (slika 1).



Slika 1 . ROC analiza za globalnu DNA metilaciju

4.5. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om u odnosu na mejotičku diobu u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21

Analiza globalne DNA metilacije u odnosu na mejotičku diobu u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 provedena je na uzorku od 88 majki djece s DS-om. U 85% (75/88) slučajeva radilo se o majkama kod kojih je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma u prvoj mejotičkoj diobi (MI majke), a u 15% (13/88) slučajeva o majkama u kojih je utvrđeno nerazdvajanje kromosoma u drugoj mejotičkoj diobi (MII majke). U tablici 18 su prikazani opći podatci ispitivanih grupa i kontrole. U četiri slučaja bio je dostupan samo podatak o starosnoj dobi. Statistički značajno viši BMI su imale MI majke u odnosu na majke zdrave djece ($P<0,05$).

Učestalost unosa pripravaka folne kiseline u ispitivanih grupa prikazana je u tablici 19. Majke zdrave djece su, općenito, statistički značajno češće konzumirale pripravke folne kiseline u trudnoći nego MI majke ($P<0,05$). Razlika u učestalosti perikoncepcijalne primjene folne kiseline između ispitivanih grupa nije bila statistički značajna ($P>0,05$).

Distribucija *MTHFR* C677T genotipova bila je u skladu s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u MI majki ($P=0,996$) i u MII majki ($P=0,573$) (tablica 20). Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji pojedinih genotipova i alela navedenog polimorfizma između majki MI i MII ($P>0,05$), kao niti u odnosu na kontrolnu grupu majki ($P>0,05$).

Tablica 18. Opći podatci MI majki (N=75), MII majki (N=13) i majki zdrave djece (N=100)

	MI Majke	MII majke	P	Kontrola	P'	P''
Starosna dob (godine) Medijan [raspon]	38 [18 - 64]	42 [30 - 52]	0,093	39 [23 - 65]	0,793	0,197
BMI ⁺ Medijan [raspon]	25,10 [17,19 – 39,68]	22,48 [17,71 - 36,73]	0,600	23,48 [18,07 – 34,60]	0,005	0,535
Prehrana N ⁺ (%)						
Bogata folatima	28 (39)	7 (54)		66 (70)		
Siromašna folatima	43 (61)	6 (46)		28 (30)		
Uživanje duhanskog dima do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)						
Ne	35 (49)	5 (38)		60 (64)		
Da	36 (51)	8 (62)		34 (36)		
Uživanje duhanskog dima u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)						
Ne	47 (66)	8 (62)		62 (66)		
Da	24 (34)	5 (38)		32 (34)		
Konzumiranje alkohola do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)						
Ne	50 (70)	10 (77)		73 (78)		
Da	21 (30)	3 (23)		21 (22)		
Konzumiranje alkohola u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)						
Ne	54 (76)	10 (77)		78 (83)		
Da	17 (24)	3 (23)		16 (17)		
Korištenje lijekova do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)						
Ne	60 (85)	12 (92)		81 (86)		
Da	11 (15)	1 (8)		13 (16)		
Korištenje lijekova u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)						
Ne	66 (93)	13 (100)		83 (88)		
Da	5 (7)	0 (0)		11 (12)		

⁺ MI majke (N=71); MII majke (N=13); kontrola (N=94);

P' – statistička značajnost između MI majki i kontrolne grupe,

P'' – statistička značajnost između MII majki kontrolne grupe

Tablica 19. Učestalost unosa pripravaka folne kiseline u MI i MII majki te majki zdrave djece

Unos pripravaka folne kiseline						
	MI majke* N (%)	MII majke** N (%)	P OR (95%CI)	Kontrola*** N (%)	P' OR (95%CI)	P'' OR (95%CI)
Ne	48 (68)	8 (62)	0,670 1,30 (0,38 – 4,43)	44 (47)	0,008 2,37 (1,25 – 4,50)	0,324 1,82 (0,55 – 5,97)
Da	23 (32)	5 (38)		50 (53)		
Perikoncepcija primjena						
Ne	68 (96)	13 (100)	0,835 0,72 (0,04 – 14,86)	86 (91)	0,284 2,11 (0,54 - 8,25)	0,511 2,65 (0,14 – 48,67)
Da	3 (4)	0 (0)		8 (9)		

*N=71; **N=13; ***N=94;

P' – statistička značajnost između MI majki i kontrolne grupe,

P'' – statistička značajnost između MII majki kontrolne grupe

Tablica 20. Učestalost genotipova i alela *MTHFR C677T* polimorfizma u MI i MII majki te majki zdrave djece

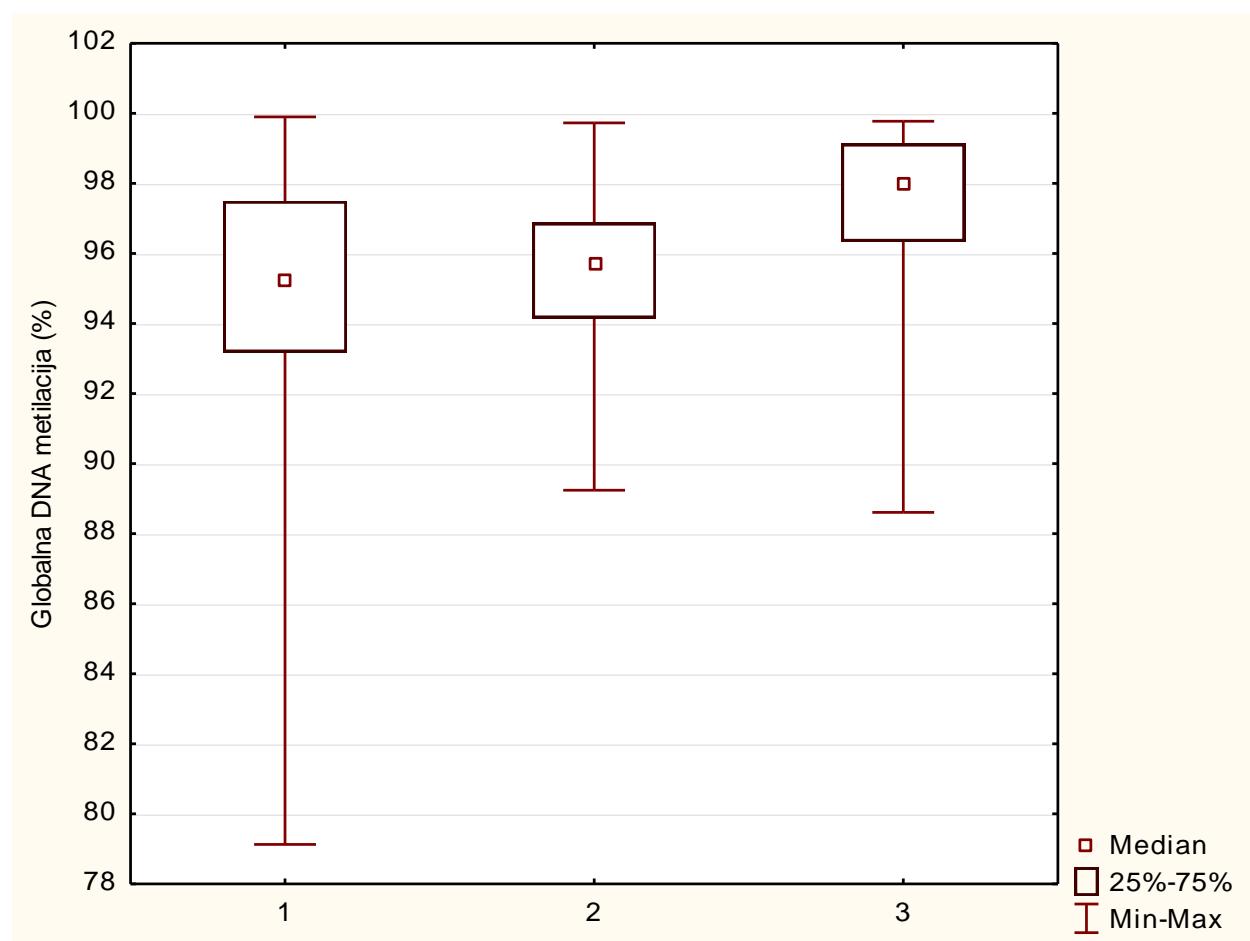
	MI majke * N (%)	MII majke ** N (%)	P OR (95%CI)	Kontrola*** N (%)	P' OR (95%CI)	P'' OR (95%CI)
MTHFR C677T genotip						
CC	35 (47)	10 (77)	Referentni genotip	49 (49)	Referentni genotip	Referentni genotip
CT	32 (43)	2 (15)	0,061 0,22 (0,04 -1,07)	42 (42)	0,841 0,94 (0,50 – 1,76)	0,070 4,29 (0,89 – 20,67)
TT	8 (10)	1 (8)	0,460 0,44 (0,05 – 3,93)	9 (9)	0,682 0,80 (0,28 – 2,29)	0,584 1,84 (0,21 – 16,17)
CT+TT	40 (53)	3 (23)	0,055 0,26 (0,07 – 1,03)	51 (51)	0,760 0,92 (0,50 – 1,66)	0,071 3,50 (0,90 – 13,36)
Alel						
C	102	22	Referentni alel	140 (70)	Referentni alel	Referentni alel
T	48	4	0,096 0,39 (0,13 – 1,18)	60 (30)	0,689 0,91 (0,58 – 1,44)	0,129 2,36 (0,78 – 7,13)

*N=75; **N=13; ***N=100

P' – statistička značajnost između MI majki i kontrolne grupe,

P'' – statistička značajnost između MII majki kontrolne grupe

Vrijednosti globalne DNA metilacije u ispitivanim grupama prikazane su na slici 2. Medijan globalne DNA metilacije u MI majki je bio 95,25%, u MII majki 95,71%, a u majki zdrave djece 97,99%. MI i MII majke se nisu statistički značajno razlikovale u globalnoj DNA metilaciji ($P=1,000$), ali su zato majke MI imale statistički značajno niže vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na kontrolnu grupu majki ($P=0,000$). Statistički značajna razlika u globalnoj DNA metilaciji utvrđena je između MII majki i majki zdrave djece ($P=0,018$).



Slika 2 . Globalna DNA metilacija u MI majki (1), MII majki (2) i u kontrolnoj grupi (3)

Utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika kao prediktora za globalnu DNA metilaciju analiziran je pomoću stupnjevite multiple regresijske analize zasebno u MI majki i u MII majki. Kao nezavisne varijable bile su uključene starosna dob, dobna skupina, BMI, unos folata prehranom, MTHFR C677T genotip, MTHFR C677T genotip/prehrana, uživanje

duhanskog dima, konzumacija alkohola, korištenje lijekova i terapijska skupina kojoj lijek pripada. Uživanje duhanskog dima, konzumacija alkohola i korištenje lijekova su bili definirani s dvije varijable, odnosno do 6. tjedna trudnoće i u trenutku uzorkovanja. Varijabla *MTHFR* C677T genotip/prehrana je bila jedini prediktor koji je statistički značajno utjecao na varijabilnost globalne DNA metilacije u MI majki, s udjelom od 6,2% ($P<0,05$) (tablica 14). U MII majki nije utvrđen niti jedan statistički značajan prediktor koji bi utjecao na globalnu DNA metilaciju.

Tablica 21. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za globalnu DNA metilaciju u MI majki

MI majke (N=71)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	β	r	Promjena multiplog R^2	P
Globalna DNA metilacija	<i>MTHFR</i> C677T genotip/prehrana	0,250	0,250	0,062	0,036

Kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=4, F za izlazak=1.

β – koeficijent korelacije nezavisne varijable sa zavisnom; r – parcijalna korelacija nezavisne varijable sa zavisnom

Vrijednosti globalne DNA metilacije u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana u MI majki prikazane su u tablici 22.

Tablica 22. Globalna DNA metilacija u MI majki u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana

MI majke (N=71)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>MTHFR</i> C677T genotip/prehrana		
CC/prehrana bogata folatima	14 (20)	96,24 [90,70 - 99,68]
CT+TT/prehrana bogata folatima	14 (20)	94,42 [90,56 - 99,90]
CC/prehrana siromašna folatima	18 (25)	95,00 [91,36 - 98,95]
CT+TT/prehrana siromašna folatima	25 (35)	94,14 [79,13 - 99,27]

Kruskal-Wallis $P=0,082$

Kombinacija *MTHFR* C677T genotip/prehrana nije imala statistički značajan učinak na globalnu DNA metilaciju u MII majki ($P=0,819$).

4.6. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om u odnosu na prisutnost CHD-a u djeteta s DS-om

U ispitivanoj grupi je bilo 49% (46/94) majki djece s DS-om i CHD-om (DS-CHD⁺) i 51% majki djece s DS-om bez CHD-a (47/94) (DS-CHD⁻). U 80% (37/46) slučajeva CHD-a radilo se o septalnom defektu (defekt septuma atrija, defekt septuma ventrikula, kompletni atrioventrikularni kanal), a u ostalim slučajevima o tetralogiji Fallot, otvorenom duktusu Botalli i zajedničkom arterijskom trunkusu. U tablici 23 su prikazani opći podatci ispitivanih grupa. Majke djece s DS-CHD⁺ su bile statistički značajno mlađe u odnosu na majke djece s DS-CHD⁻ ($P<0,05$). Učestalost prehrane bogate folatima je bila statistički značajno veća u majki zdrave djece u odnosu na majke djece s DS-CHD⁺ ($P<0,05$) kao i u odnosu na majke djece s DS-CHD⁻ ($P<0,05$). Majke djece s DS-CHD⁺ su statistički značajno češće uživale duhanski dim do 6. tjedna trudnoće u odnosu na majke djece s DS-CHD⁻ ($P<0,05$) i u odnosu na majke zdrave djece ($P<0,05$).

Učestalost unosa pripravaka folne kiseline u majki djece s DS-CHD⁺, majki djece s DS-CHD⁻ i kontrolne grupe majki prikazana je u tablici 24. Majke djece DS-CHD⁻ su statistički značajno rjeđe konzumirale pripravke folne kiseline općenito u trudnoći ($P<0,05$). U perikoncepcijskoj primjeni folne kiseline nije utvrđena statistički značajna razlika između majki djece s DS-CHD⁺ i majki djece s DS-CHD⁻ ($P>0,05$), kao niti u odnosu na majke zdrave djece ($P>0,05$).

Distribucija *MTHFR* C677T genotipova bila je u skladu s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u grupi majki djece s DS-CHD⁺ ($P=1,000$) i u grupi majki djece s DS-CHD⁻ ($P=0,899$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji pojedinih genotipova i alela navedenog polimorfizma između majki djece s DS-CHD⁺ i majki djece s DS-CHD⁻ ($P>0,05$), kao niti u odnosu na kontrolnu skupinu ($P>0,05$) (tablica 25).

Tablica 23. Opći podatci majki djece s DS-CHD⁺ (N=46), majki djece s DS-CHD⁻ (N=47) i majki zdrave djece (N=100)

	Majke djece DS-CHD ⁺	Majke djece DS-CHD ⁻	P	Kontrola	P'	P"
Starosna dob (godine) Medijan [raspon]	37 [24 - 59]	42 [18 - 64]	0,010	39 [23 - 65]	0,160	0,277
BMI ⁺ Medijan [raspon]	24,19 [17,19 – 35,43]	26,01 [17,71 – 40,40]	0,091	23,48 [18,07 – 34,60]	0,239	0,002
Prehrana N ⁺ (%)						
Bogata folatima	16 (36)	21 (46)		66 (70)		
Siromašna folatima	28 (64)	45 (54)	0,248	28 (30)	0,000	0,008
Uživanje duhanskog dima do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)						
Ne	15 (34)	29 (63)		60 (64)		
Da	29 (66)	17 (37)	0,005	34 (36)	0,001	0,536
Uživanje duhanskog dima u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)						
Ne	27 (71)	33 (72)		62 (66)		
Da	17 (39)	13 (28)	0,206	32 (34)	0,367	0,313
Konzumiranje alkohola do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)						
Ne	31 (70)	33 (72)		73 (78)		
Da	13 (30)	13 (28)	0,539	21 (22)	0,239	0,286
Konzumiranje alkohola u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)						
Ne	32 (73)	37 (80)		78 (83)		
Da	12 (30)	9 (20)	0,270	16 (17)	0,122	0,440
Korištenje lijekova do 6. tjedna trudnoće N ⁺ (%)						
Ne	38 (86)	39 (85)		81 (86)		
Da	6 (14)	7 (15)	0,535	13 (16)	0,601	0,506
Korištenje lijekova u vrijeme uzorkovanja N ⁺ (%)						
Ne	42 (95)	43 (93)		83 (88)		
Da	2 (5)	3 (7)	0,521	11 (12)	0,151	0,261

⁺ majke djece s DS-CHD+ (N=44); majke djece s DS-CHD- (N=46); kontrola (N=94)

P' – statistička značajnost između majki djece s DS-CHD⁺ i kontrolne grupe

P" – statistička značajnost između majki djece s DS-CHD⁻ i kontrolne grupe

Tablica 24. Učestalost unosa pripravaka folne kiseline u majki djece s DS-CHD⁺, majki djece s DS-CHD⁻ i majki zdrave djece

Unos pripravaka folne kiseline						
	Majke djece DS-CHD ⁺ * N (%)	Majke djece DS-CHD ⁻ ** N (%)	P OR (95%CI)	Kontrola*** N (%)	P' OR (95%CI)	P'' OR (95%CI)
Ne	25 (57)	33 (72)	0,142 0,52 (0,22 – 1,25)	44 (47)	0,274 1,50 (0,73 – 3,08)	0,006 2,88 (1,35 – 6,16)
Da	19 (43)	13 (28)		50 (53)		
Perikoncepcijska primjena						
Ne	41 (93)	46 (100)	0,177 0,13 (0,01 – 2,54)	86 (91)	0,733 1,27 (0,32 – 5,04)	0,131 9,14 (0,52 – 161,9)
Da	3 (7)	0 (0)		8 (9)		

*N=44; **N=46; ***N=94

P' – statistička značajnost između majki djece s DS-CHD⁺ i kontrolne grupe

P'' – statistička značajnost između majki djece s DS-CHD⁻ i kontrolne grupe

Tablica 25. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u majki djece s DS-CHD⁺, majki djece s DS-CHD⁻ i majki zdrave djece

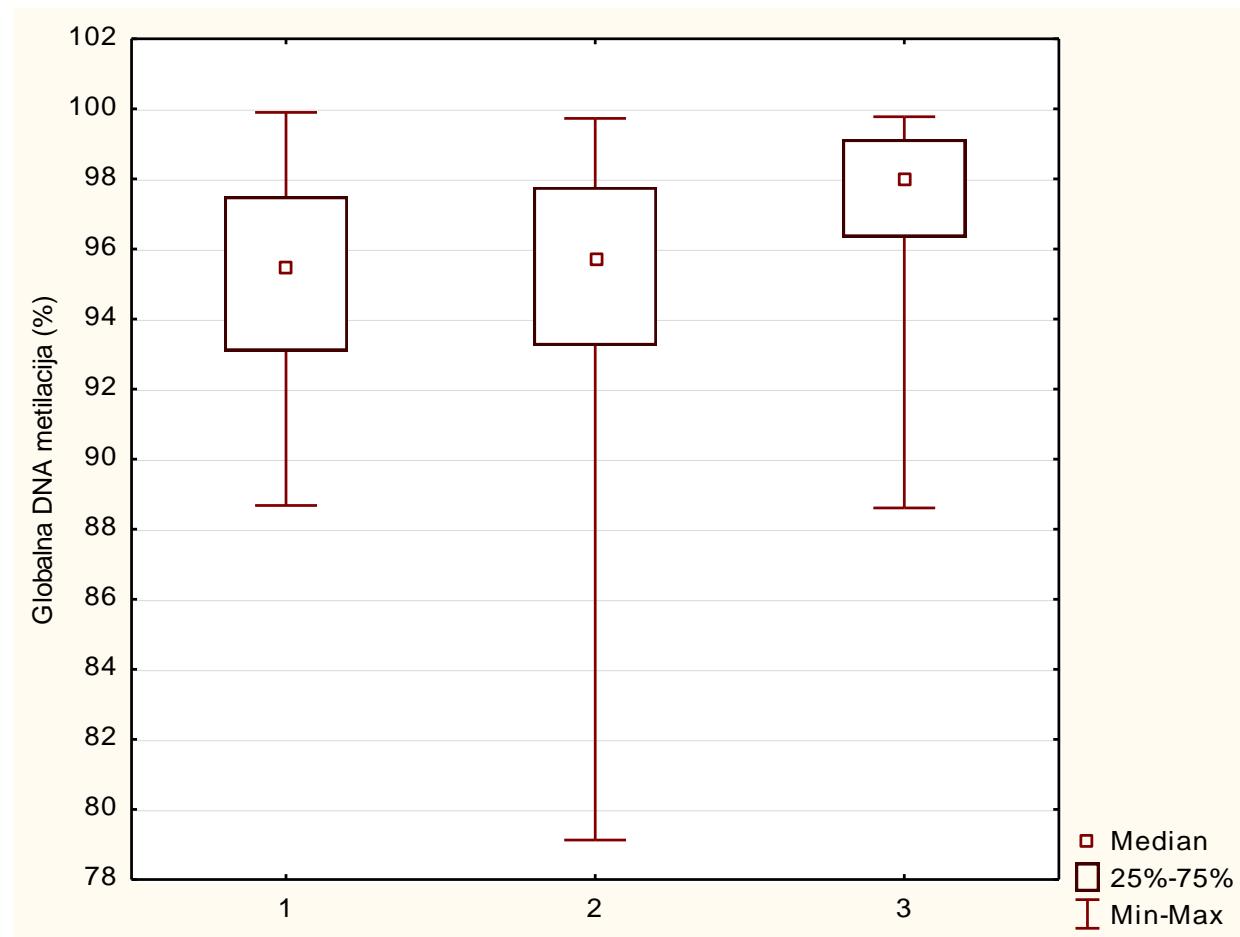
	Majke djece DS-CHD ⁺ * N (%)	Majke djece DS-CHD ⁻ ** N (%)	P OR (95%CI)	Kontrola*** N (%)	P' OR (95%CI)	P'' OR (95%CI)
MTHFR C677T genotip						
CC	23 (50)	22 (47)	Referentni genotip	49 (49)	Referentni genotip	Referentni genotip
CT	19 (41)	19 (40)	0,920 1,05 (0,44 – 2,48)	42 (42)	0,922 1,04 (0,50 – 2,16)	0,984 0,99 (0,47 – 2,08)
TT	4 (9)	6 (13)	0,527 1,57 (0,39 – 6,32)	9 (9)	0,933 1,06 (0,29 – 3,79)	0,500 0,67 (0,21 – 2,12)
CT+TT	23 (50)	25 (53)	0,758 1,14 (0,50 – 2,56)	51 (51)	0,911 1,04 (0,52 – 2,09)	0,904 0,92 (0,46 – 1,83)
Alel						
C	65 (71)	63 (67)	Referentni alel	140 (70)	Referentni alel	Referentni alel
T	27 (29)	31 (33)	0,593 1,18 (0,64 – 2,21)	60 (30)	0,910 1,03 (0,60 – 1,77)	0,607 0,87 (0,51 – 1,47)

*N=44; **N=46; ***N=100

P' – statistička značajnost između majki djece s DS-CHD⁺ i kontrolne grupe

P'' – statistička značajnost između majki djece s DS-CHD⁻ i kontrolne grupe

Globalna DNA metilacija u ispitivanih grupa prikazana je na slici 3. Medijan vrijednosti globalne DNA metilacije u majki djece s DS-CHD⁺ bio je 95,45%, u majki djece s DS-CHD⁻ 95,71%, a u kontrolnoj grupi je bio 97,99%. Između majki djece s DS-CHD⁺ i majki djece s DS-CHD⁻ nije bilo statistički značajne razlike u globalnoj DNA metilaciji ($P=0,951$). Međutim, majke zdrave djece su imale statistički značajno više vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na majke djece s DS-CHD⁺ ($P=0,001$), kao i u odnosu na majke djece s DS-CHD⁻ ($P=0,000$).



Slika 3 . Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-CHD⁺ (1), majki djece s DS-CHD⁻ (2) i u kontrolnoj grupi (3)

Stupnjevitom multiplom regresijskom analizom čimbenika koji su utjecali na globalnu DNA metilaciju u majki djece s DS-CHD⁺ utvrđeno je da su BMI i *MTHFR* C677T genotip/prehrana bili jedini statistički značajni prediktori (Tablica 26). Kao nezavisne varijable analizirane su starosna dob, dobna skupina, BMI, korištenje pripravaka folata, perikoncepcijska primjena folata, unos namirnica bogatih folatima, *MTHFR* C677T genotip, *MTHFR* C677T genotip/prehrana, uživanje duhanskog dima, konzumacija alkohola, korištenje lijekova i terapijska skupina kojoj lijek pripada. Uživanje duhanskog dima, konzumacija alkohola, korištenje lijekova bili su definirani s dvije varijable: do 6. tjedna trudnoće i u trenutku uzorkovanja. Kao nezavisna varijabla je bila uključena i prisutnost septalnog defekta u djeteta s DS-om. Utvrđeno je da BMI određuje 14,1% varijabilnosti globalne DNA metilacije. Negativne β vrijednosti za BMI pokazuju da se s povišenjem BMI snižavaju vrijednosti globalne DNA metilacije ($P<0,05$) (tablica 26). *MTHFR* C677T genotip/prehrana je statistički značajno utjecao na varijabilnost globalne DNA metilacije, s udjelom od 9,9% ($P<0,05$) (tablica 26).

Ista analiza provedena je samo u grupi majki djece s DS-om i septalnim defektom, uz isključenje varijable prisutnost septalnog defekta u djeteta s DS-om. Također, varijabla *MTHFR* C677T genotip/prehrana bila je jedina statistički značajno utjecala na varijabilnost globalne DNA metilacije, ali s nešto većim udjelom od 15,4% ($P<0,05$) (Tablica 26). Istom analizom provedenom u grupi majki djece s DS-CHD⁻ nije utvrđen niti jedan statistički značajan prediktor koji bi utjecao na globalnu DNA metilaciju.

Tablica 26. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za globalnu DNA metilaciju u majki djece s DS-CHD+ i u majki djece s DS-om i septalnim defektom

Majke djece s DS-CHD ⁺ (N = 44)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	β	r	Promjena multiplog R ²	P
Globalna DNA metilacija	BMI	-0,212	-0,346	0,141	0,012
	MTHFR C677T genotip / prehrana	0,792	0,339	0,099	0,026
Majke djece s DS-om i septalnim defektom (N = 36)					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	β	r	Promjena multiplog R ²	P
Globalna DNA metilacija	MTHFR C677T genotip / prehrana	0,945	0,392	0,154	0,018

Kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=4, F za izlazak=1.

β – koeficijent korelacije nezavisne varijable sa zavisnom; r – parcijalna korelacija nezavisne varijable sa zavisnom

U tablici 27 prikazane su vrijednosti globalne DNA metilacije u ovisnosti o BMI u majki djece s DS-CHD⁺. Majke su podijeljene ovisno o BMI u četiri skupine prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (218).

Tablica 27. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-CHD⁺ u ovisnosti o BMI

Majke djece s DS-CHD ⁺ (N = 44)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>BMI</i>		
<18,5	3	95,71 [90,56 - 97,33]
18,5 – 24,9	17	94,74 [79,13 - 99,36]
25 – 29,9	17	96,18 [90,43 - 99,48]
≥30	9	95,07 [89,72 - 99,73]

Kruskal-Wallis P=0,063

U tablicama 28 i 29 prikazane su vrijednosti globalne DNA metilacije u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotipa/prehrana u majki djece s DS-CHD⁺ (tablica 28) i u majki djece s DS-om i septalnim defektom (tablica 29).

Tablica 28. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-CHD⁺ u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana

Majke djece s DS-CHD ⁺ (N = 44)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>MTHFR</i> C677T genotip/prehrana		
CC/prehrana bogata folatima	9 (21)	98,67 [94,17 – 99,68]
CT+TT/prehrana bogata folatima	12 (27)	94,56 [91,99 – 99,90]
CC/prehrana siromašna folatima	7 (16)	94,53 [91,36 – 98,47]
CT+TT/prehrana siromašna folatima	16 (36)	93,97 [88,67 – 99,15]

Kruskal-Wallis P=0,063

Tablica 29. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om i septalnim defektom u ovisnosti o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana

Majke djece s DS-om i septalnim defektom (N = 36)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>MTHFR</i> C677T genotip/prehrana		
CC/prehrana bogata folatima	9 (25)	98,67 (94,17 – 99,68)
CT+TT/prehrana bogata folatima	6 (17)	94,42 (91,99 – 99,90)
CC/prehrana siromašna folatima	9 (25)	93,80 (91,35 – 98,47)
CT+TT/prehrana siromašna folatima	12 (33)	93,97 (88,67 – 99,15)

Kruskal-Wallis P=0,059

4.7. Globalna DNA metilacija u osoba s DS-om

Analiza globalne DNA metilacije provedena je na uzorku kojeg su činile 42 osobe s DS-om.

Medijan starosne dobi iznosio je 14 godina [0,08 - 48]. U tablici 30 prikazana je distribucija spola i CHD-a u osoba s DS. Učestalost CHD-a s obzirom na spol nije se statistički značajno razlikovala ($P=0,409$).

Tablica 30. Distribucija spola i CHD-a u osoba s DS-om (N=42)

	CHD N (%)	
Spol N (%)	DS-CHD ⁺ 15 (36)	DS-CHD ⁻ 27 (64)
Muški	7 (47)	15 (56)
Ženski	8 (53)	12 (44)

Distribucija *MTHFR C677T* genotipova prikazana u tablici 31 bila je u skladu s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u osoba s DS-om ($P=0,974$), kao i u grupi osoba s DS-CHD⁺ ($P=0,984$) i u grupi osoba s DS-CHD⁻ ($P=1,000$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji pojedinih genotipova i alela između ispitivanih grupa osoba s DS-om ($P>0,05$).

Tablica 31. Učestalost genotipova i alela *MTHFR C677T* polimorfizma u ispitanika s DS-CHD+ i ispitanika s DS-CHD-

<i>MTHFR C677T</i>	DS-CHD+ * N (%)	DS-CHD- ** N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
CC	5 (33)	14 (52)	Referentni genotip	
CT	8 (54)	11 (41)	0,49 (0,13 – 1,93)	0,308
TT	2 (13)	2 (7)	0,36 (0,04 – 3,26)	0,361
CT+TT	10 (67)	13 (48)	0,46 (0,13 – 1,72)	0,464
Alel				
C	18 (60)	39 (72)	Referentni alel	
T	12 (40)	15 (28)	0,58 (0,22 – 1,48)	0,253

*N=15; **N=27

Vrijednosti globalne DNA metilacije u svih ispitanika s DS-om, kao i u grupama ispitanika s DS-CHD⁺ i DS-CHD⁻ prikazane su u tablici 32. Između osoba s DS-CHD⁺ i osoba s DS-CHD⁻ nije utvrđena statistički značajna razlika u globalnoj DNA metilaciji ($P=0,227$).

Tablica 32. Vrijednosti globalne DNA metilacije u ispitanika s DS-om

Ispitanici	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
DS	98,74 [95,20 - 99,95]
*DS-CHD ⁺	98,64 [95,20 - 99,68]
*DS-CHD ⁻	99,02 [95,66 - 99,95]

*Mann-Whitney $P=0,227$

U osoba s DS-om provedena je stupnjevita multipla regresijska analiza za globalnu DNA metilaciju, a kao nezavisne varijable bile su uključene starosna dob, spol, *MTHFR* C677T genotip i prisutnost CHD-a. U analizu su također bile uključene nezavisne varijable koje se odnose na majke djece s DS-om: *MTHFR* C677T genotip, unos folata prehranom, *MTHFR* C677T genotip/ prehrana, te uživanje duhanskog dima, konzumacija alkohola i lijekova do 6. tjedna trudnoće. Spol ispitanika je bio jedini statistički značajan prediktor varijabilnosti globalne DNA metilacije. Utvrđena je statistički značajna vjerojatnost od 19,1% da će ispitanici s DS-om ženskog spola imati niže vrijednosti globalne DNA metilacije nego ispitanici s DS-om muškog spola ($P<0,05$) (tablica 33).

Tablica 33. Sažetak stupnjevite multiple regresijske analize za globalnu metilaciju DNA u ispitanika s DS-om

Ispitanici s DS-om					
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	β	r	Promjena multiplog R^2	P
Globalna DNA metilacija	spol ispitanika	- 0,437	-0,437	0,191	0,025

kriteriji za ulazak i izlazak nezavisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=4, F za izlazak=1.

β – koeficijent korelacije nezavisne varijable sa zavisnom; r – parcijalna korelacija nezavisne varijable sa zavisnom varijablom

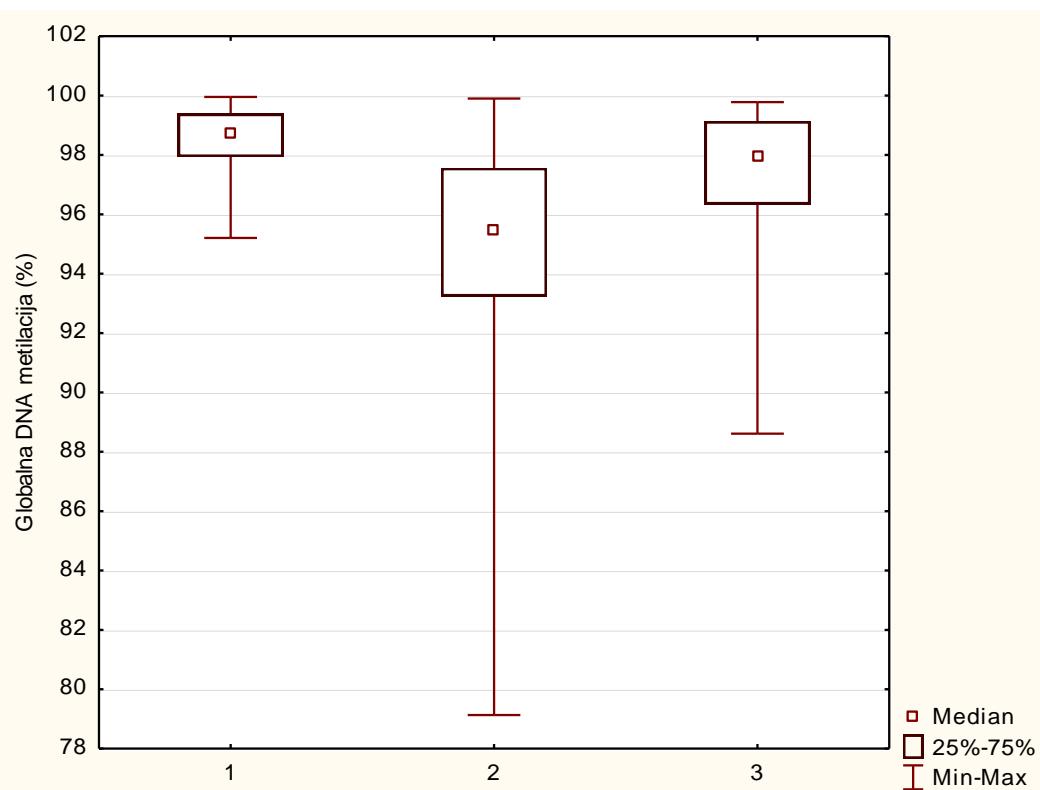
U tablici 34 prikazane su vrijednosti globalne DNA metilacije u ispitanika s DS-om ovisno o spolu.

Tablica 34. Vrijednosti globalne DNA metilacije u ispitanika s DS-om ovisno o spolu

Ispitanici s DS-om (N = 42)	N (%)	Globalna DNA metilacija (%) Median [raspon]
<i>Spol</i>		
Muški	22 (52)	99,06 [95,66 – 99,95]
Ženski	20 (48)	98,31 [95,20 – 99,78]

Mann-Whitney P=0,068

Na slici 4 prikazane su vrijednosti globalne DNA metilacije u ispitanika s DS-om, majki djece s DS-om i majki zdrave djece. Djeca s DS-om su imala statistički značajno više vrijednosti globalne metilacije u odnosu na njihove majke (P=0,000). Također, ispitanici s DS-om su imali statistički značajno više vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na majke zdrave djece (P=0,018).



Slika 4 . Globalna DNA metilacija u ispitanika s DS-om (1), majki djece s DS-om (2) i u majki zdrave djece (3)

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi povezanosti globalne DNA metilacije u majki djece s DS-om i nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 te razvoja sindromskog CHD-a. Dodatno, ispitivan je i utjecaj endogenih i egzogenih čimbenika na globalnu DNA metilaciju, kao što su MTHFR C677T polimorfizam, spol, starosna dob, BMI, unos folata putem prehrane, perikoncepcijski unos pripravaka folata, uživanje duhanskog dima i alkohola te primjena lijekova. U istraživanje su bile uključene samo majke s trisomijom 21 majčinog podrijetla u kojih je točno određena mejotička dioba u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21. Na taj smo način dobili mogućnost da analiziramo globalnu DNA metilaciju kao majčin rizični čimbenik za DS općenito, ali i zasebno kao čimbenik rizika za MI i MII nerazdvajanje kromosoma za koje neki autori smatraju da je uzrokovano istim mehanizmom, a drugi pak prepostavljaju različite uzročnike. Ujedno ovo je prvo takvo istraživanje, a dobiveni rezultati nesumnjivo otvaraju jedno sasvim novo područje sagledavanja mehanizama koji dovode do nestabilnosti kromosoma koje za posljedicu imaju produkciju velikog broja aneuploidnih gameta, posebno u žena. DNA metilacija povezuje se i s razvojem CHD kao izolirane abnormalnosti, ali i abnormalnosti prisutne u sklopu pojedinih sindroma. U slučajevima DS-a kongenitalne srčane greške prisutne su u 40%-60% slučajeva pa je interesantno vidjeti postoji li razlika u globalnoj DNA metilaciji u onih koji imaju i onih koji nemaju CHD. Isto tako, postavlja se pitanje ima li majčin status globalne DNA metilacije utjecaja na razvoj CHD-a u djece s DS-om, s obzirom da su u majki djece s izoliranim CHD-om utvrđene statistički značajno niže vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na majke zdrave djece.

U ovom radu globalna DNA metilacija je analizirana u limfocitima periferne krvi, i to kvantifikacijom metilacije LINE-1 pomoću MethyLight metode. MethyLight je kvantitativna real-time PCR metoda koja ima visoku osjetljivost i visoku specifičnost te detektira potpuno metilirane i potpuno nemetilirane sekvene DNA, dok se djelomično metilirane DNA sekvene ne mogu detektirati (14,213-215). Globalnu DNA metilaciju odredili smo pomoću

formule za apsolutnu kvantifikaciju, ali smo je modificirali tako što smo uvrstili PMR i PUR vrijednosti s obzirom da su one korigirane pomoću ALU-C4 endogene kontrole u odnosu na unos DNA. Općenito, dobivene vrijednosti, odnosno postotci, globalne DNA metilacije u limfocitima periferne krvi u okviru su s vrijednostima koje su utvrdili i drugi autori i kreću se 79% - 100% (14,77,216).

Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om

Ovim istraživanjem utvrđeno je da su majke koje su rodile dijete s DS-om imale statistički značajno niže vrijednosti globalne DNA metilacije, odnosno globalnu DNA hipometilaciju u odnosu na majke zdrave djece. Primjenom ROC analize utvrdili smo kriterijsku vrijednost globalne DNA metilacije od 96,42% koja je u svih majki uključenih u istraživanje (N=194) s najvećom preciznošću odjeljivala one koje su imale dijete s DS-om od onih koje nisu. Ukupno, 64% majki djece s trisomijom 21 imalo je globalnu DNA metilaciju nižu do 96,42%. Utvrđeno je da su majke starije od 35 godina imale globalnu DNA hipometilaciju u odnosu na mlađe majke (≤ 35 godina). Iako bez statistički značajne razlike, majke s *MTHFR* 677TT genotipom su imale najniže vrijednosti globalne DNA metilacije. Uz prehranu siromašnu folatima utvrđena je statistički značajno niža globalna DNA metilacija u odnosu na prehranu bogatu folatima. Što se tiče kombinacije pojedinog *MTHFR* C677T genotipa i unosa folata putem prehrane (*MTHFR* C677T genotip/prehrana), jasno su utvrđene najviše vrijednosti globalne DNA metilacije u majki CC genotipa i prehrane bogate folatima, dok su majke CT+TT genotipa, a koje su konzumirale hranu siromašnu folatima imale najniže vrijednosti. Statistički značajna razlika u globalnoj DNA metilaciji je postojala upravo između ovih dviju spomenutih grupa majki. U grupi majki djece s DS-om uočili smo sličan trend, ali nije bilo statistički značajne razlike. Uživanje duhanskog dima i alkohola nisu se pokazali kao statistički značajni čimbenici koji utječu na globalnu DNA metilaciju. Rezultati ovakvih istraživanja kontradiktorni su i ovise o metodi, veličini ispitivane populacije, kao i o tipu stanica u kojima se utvrđivala globalna DNA metilacija, tako da su naši rezultati u skladu

sa studijama u kojima je globalna DNA metilacija utvrđena na temelju metilacije LINE-1 elemenata u limfocitima periferne krvi (74,86,217). Isto tako, nismo utvrdili statistički značajan učinak lijekova na globalnu DNA metilaciju, što je razumljivo obzirom da je u trenutku uzorkovanja svega 6% majki djece s DS-om i 12% majki u kontrolnoj grupi, konzumiralo neki lijek i to iz različitih terapijskih skupina, te je za konačne zaključke o djelovanju pojedine skupine lijekova na globalnu DNA metilaciju potreban veći broj ispitanika.

Brojna istraživanja pokazuju da se sa starosnom dobi snižava globalna DNA metilacija što se smatra rizičnim čimbenikom za razvoj različitih poremećaja povezanih sa starenjem, uključujući tumore, aterosklerozu, Alzheimerovu bolest i autoimune poremećaje (38,219-228). Mehanizam kojim starosna dob utječe na DNA metilaciju još uvijek nije razjašnjen, ali je vjerojatno da sam proces DNA metilacije, odnosno aktivnost DNMT enzima, metabolizam folata, ali i drugi čimbenici imaju važnu ulogu (219,229-232). Snižavanje globalne DNA metilacije sa starosnom dobi uglavnom je odraz hipometilacije ponavljajućih DNA sekvenci te se smatra da može utjecati na strukturnu organizaciju kromatina i ugroziti stabilnost genoma (219). I u našem smo istraživanju dokazali povezanost dobi s globalnom DNA metilacijom i to u majki zdrave djece i utvrđeno je da starije majke (>35 godina) imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije ($P<0,05$). Zapravo, u toj grupi žena je jedini statistički značajan prediktor globalne DNA metilacije bila starosna dob, s udjelom od 6,2%. Ako se uzme u obzir da smo utvrdili globalnu DNA hipometilaciju u majki djece s DS-om te da sa starenjem dolazi do globalne DNA hipometilacije, a rizik za DS se povećava, onda se može pretpostaviti da bi globalna DNA hipometilacija mogla predstavljati jedan od rizičnih čimbenika za trisomiju 21.

James i suradnici prvi su postavili hipotezu da, neovisno o starosnoj dobi, nedostatak folata ili premećaji u metabolizmu folata/homocisteina mogu uzrokovati hipometilaciju centromerne DNA i promjene u strukturnoj organizaciji kromatina koje negativno utječu na interakciju centromernih proteina i razdvajanje kromosoma tijekom mejoze (194). Od tada su provedena brojna istraživanja polimorfizama gena uključenih u metabolizam folata,

prvenstveno *MTHFR* C677T, kao i analize koncentracija metabolita iz puta folata/homocisteina kao rizičnih čimbenika za trisomiju 21. Rezultati našeg prethodnog istraživanja ukazuju da *MTHFR* C677T nije neovisan čimbenik rizika za trisomiju 21 i u skladu su s drugim studijama provedenim u mediteranskim zemljama, što se objašnjava protektivnim utjecajem mediteranske prehrane, bogate folatima (202, 204-212). U prilog ovoj pretpostavci ide jedno istraživanje provedeno u Egiptu koje u grupi žena kod kojih je unos folata hranom bio ispod preporučene dnevne doze, kao rizični čimbenik za DS ističe *MTHFR* 677CT i 677TT genotipove (199). S druge strane, studije provedene u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi i Kini ukazuju da je polimorfizam *MTHFR* C677T neovisan rizični čimbenik podložnosti za DS (198-201). Stoga mnogi autori sugeriraju da bi majčin metabolički fenotip mogao biti osjetljiviji pokazatelj rizika za trisomiju 21 od samog genotipa majke te su se usmjerili na analize koncentracija metabolita iz puta folata/homocisteina, prvenstveno homocisteina, kao biomarkera metilacije u majki djece s DS-om. U većini studija su utvrđene povišene razine homocisteina u majki djece s DS-om u odnosu na kontrolu, međutim, postoje i radovi koji to ne potvrđuju (194,201,203,204,206,208-210,233,234). Kohli i suradnici su čak utvrdili niže vrijednosti homocisteina u majki djece s DS-om (235). Metabolički fenotip je rezultat složene interakcije polimorfizma gena i okolišnih čimbenika uključujući prehranu, pri čemu metabolizam i nutritivne potrebe pojedinca ovise upravo o metaboličkom fenotipu (236,237). S obzirom da mnogi čimbenici utječu na razine homocisteina, uključujući trudnoću, unos folata prehranom i kombinacije polimorfizama gena uključenih u metabolizam folata, konfliktni rezultati ovih studija nisu uopće iznenadjujući, već su odraz složene interakcije različitih čimbenika u metaboličkom fenotipu. Što se tiče *MTHFR* C677T polimorfizma, dokazano je da se smanjena aktivnost *MTHFR* enzima u homozigota i heterozigota može nadomjestiti povećanjem unosa folne kiseline koja učinkovito neutralizira metabolički utjecaj ovog polimorfizma te da unos folne kiseline ili vitamina B12 ima veći učinak na varijabilnost koncentracija homocisteina u plazmi nego *MTHFR* 677T alel (238,239). Također, kvantitativnim mjeranjem globalne DNA metilacije u limfocitima periferne

krvi zdravih osoba utvrđena je povezanost između poremećaja u metabolizmu folata i globalne DNA metilacije. Dokazano je da osobe s *MTHFR* 677TT genotipom i sniženom koncentracijom folata u krvi imaju statistički značajno nižu globalnu DNA metilaciju u odnosu na osobe s CT ili CC genotipovima (109,110). U skladu sa spomenutim studijama, naši rezultati ukazuju da su unos folata putem prehrane i *MTHFR* C677T polimorfizam svaki zasebno, prediktori globalne DNA metilacije općenito u svih majki, neovisno kojoj grupi ispitanica pripadaju. Majke koje su imale prehranu siromašnu folatima imale su statistički značajno nižu globalnu DNA metilaciju u odnosu na majke koje su imale prehranu bogatu folatima. Majke s *MTHFR* 677TT genotipom su imale najniže vrijednosti globalne DNA metilacije, ali nije utvrđena statistička značajnost. S obzirom da je pojedinačni učinak unosa folata putem prehrane i *MTHFR* C677T polimorfizma na globalnu DNA metilaciju općenito u svih majki u našem istraživanju bio relativno mali, nije dosegao statističku značajnost zasebno u grupi majki djece s DS-om niti u kontrolnoj grupi majki. Međutim, utvrdili smo da je kombinacija *MTHFR* C677T genotip/prehrana imala veći doprinos na varijabilnost globalne DNA metilacije, odnosno 3,2% općenito u svih majki i 4,6% u majki djece s DS-om. Majke CT+TT genotipa i prehrane siromašne folatima su imale statistički značajno niže vrijednosti globalne DNA metilacije nego majke CC genotipa i prehrane bogate folatima općenito u svih majki zajedno. Iako nije bilo statistički značajne razlike u grupi majki djece s DS-om vidljivo je da su majke CT+TT genotipa i prehrane siromašne folatima imale najniže vrijednosti globalne DNA metilacije. Iz svega navedenog može se prepostaviti da unos folata putem prehrane i *MTHFR* C677T polimorfizam utječe na vrijednosti globalne DNA metilacije, te da CT+TT genotip u kombinaciji s neadekvatnim unosom folata može doprinjeti globalnoj DNA hipometilaciji. Iako kvantitativno mjereno globalne DNA metilacije u majki djece s DS-om do sada nije provedeno, možemo se osvrnuti na istraživanja iz drugih područja koja ukazuju da hipometilacija DNA doprinosi nestabilnosti genoma, te dovodi do nepravilnog razdvajanja kromosoma, strukturnih promjena kromosoma i gubitka konstitucijske heterozigotnosti (37,44-46,55,56,70,240-242). Većina istraživanja koja potvrđuju ovu teoriju provedena je na

tumorskim stanicama, s obzirom da je za većinu tumora karakteristična aneuploidija kao i promijenjeni obrazac metilacije u smislu globalne hipometilacije i regionalne hipermetilacije (47-54,220,243-245). Povezanost između globalne hipometilacije i kromosomske nestabilnosti sugeriraju i brojne studije provedene na stanicama pacijenata s ICF sindromom, rijetkom autosomno dominantnom bolešću uzokovanom mutacijom gena DNMT3 (46,55,57,246). U stanicama ovih pacijenata utvrđena je hipometilacija pericentromernih, centromernih, te telomernih regija kromosoma udružena s različitim strukturnim i numeričkim aberacijama kromosoma. Demetilirajući agensi i inducirana inaktivacija DNMT gena uzrokuju sniženu razinu DNA metilacije u biljnim i životinjskim stanicama, što se povezuje s nastankom aneuploidija, poliploidija i strukturnih aberacija kromosoma u ovim stanicama. Već je u uvodnom dijelu naglašena važna uloga DNA metilacije u prevladavanju štetnih učinaka ponavljajućih elemenata, kao i u formiranju i pravilnoj funkciji centromernih i telomernih regija kromosoma (44,45,247,248). Metilacijski obrazac same centromere ključan je za stabilnost centromerne DNA. Reaktivacija epigenetički utišanih ponavljajućih elemenata u centromernim i pericentromernim regijama kromosoma se povezuje s nepravilnim razdvajanjem kromosma tijekom mejoze u miševa, gubitkom kohezije sestrinskih kromatida u kvasca i gubitkom kondenzacije centromere u biljaka (249-253). Osim toga, metilacijski obrazac centromere ima važnu ulogu u vezivanju specifičnih metil-senzitivnih kinetohornih proteina koji se moraju organizirati tako da se niti diobenog vretena pričvršćuju na jedno mjesto u kinetohori, što omogućava bolju i jaču povezanost cijelog kinetohornog sustava (44,45,247,248). Ukoliko se niti diobenog vretena pričvršćuju na više mjesta, dolazi do nepravilnog razdvajanja kromosoma. U somatskih stanica takvi propusti tijekom mitoze mogu dovesti do nastanka tumora, dok u spolnim stanicama nepravilno razdvajanje kromosoma tijekom mejoze može dovesti do nastanka aneuplodnih gameta (44,254,255). Istraživanja pokazuju da se kinetohore mogu formirati i na potpuno novim sekvencama koje funkcionišu poput normalnih centromera iako nisu homologne onima u normalnim centromerama što ukazuje da su centromere sisavaca primarno definirane epigenetičkim mehanizmima te da

osnovna DNA sekvenca nije neophodna (44,45,256-259). Osim toga, brojne studije ukazuju da metilacija DNA ima važnu ulogu u regulaciji duljine telomera, kao i u suzbijanju rekombinacije između telomernih ponavljanja (43,60,260,261). Međutim, djelovanje DNA metilacije na duljinu telomera nije još u potpunosti razjašnjeno, s obzirom da je uočen različit učinak DNA hipometilacije na stanice u različitim razvojnim fazama, kao i na stanice različitih organizama.

Na temelju navedenih spoznaja i rezultata dobivenih u našem istraživanju možemo pretpostaviti da je globalna DNA hipometilacija u majki djece s DS-om odraz DNA hipometilacije kromosomskih regija čija je funkcija neophodna za pravilno razdvajanje kromosoma, što može narušiti stabilnost centromere, odnosno telomere, ili dovesti do promjena u formiranju kinetohornog sustava, a time i do pogrešaka u razdvajaju kromosoma. Većina nepravilnog razdvajanja kromosoma događa se tijekom MI diobe koja se povezuje s izostankom rekombinacije ili pak sa samo jednom rekombinacijom (183,190,262,263). Ovakav, promijenjen obrazac rekombinacije smatra se rizičnim čimbenikom neovisnim o starosnoj dobi majke i odnosi se uglavnom na mlađe majke. Sigurdsson i suradnici su kreirali model metilacijskog obrasca zmetnih stanica čovjeka, koristeći HapMap bazu podataka polimorfizma jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphisms – SNP) te su definirali SNP koji su koristili kao marker za metilaciju. Uočili su pozitivnu korelaciju između DNA metilacije i rekombinacije i sugerirali da bi DNA metilacija mogla biti marker koji obilježava mjesto na kojem će doći do rekombinacije, ali i mehanizam koji onemogućava daljnju rekombinaciju u istoj ili bliskoj regiji (264). Stoga je moguće da uslijed globalne DNA hipometilacije, mjesta na kojima bi se trebala dogoditi rekombinacija nisu adekvatno obilježena što bi moglo rezultirati promijenjenim obrascem rekombinacije kao što je npr. izostanak rekombinacije. Ovu pretpostavku temeljimo na dva važna rezultata koja smo dobili u prethodnom i ovom sadašnjem istraživanju, a radi se o sljedećem: prvo, da je u 79% slučajeva MI nerazdvajanja utvrđen izostanak rekombinacije (183) i da majke kod kojih se nepravilno razdvajanje kromosoma 21 dogodilo u MI diobi imaju statistički značajno nižu

globalnu DNA metilaciju u odnosu na majke zdrave djece. Interesantno je spomenuti i istraživanja provedena na tumorskim stanicama i kultiviranim stanicama mišjih embrioblasta, u kojima se globalna DNA hipometilacija uglavnom povezuje s povećanim brojem rekombinacija, kao i istraživanja provedena na spolnim stanicama biljaka u kojima se globalna DNA hipometilacija povezuje s promjenom obrasca, ali ne i broja rekombinacija između homolognih kromosoma (43,60,61,243,265). Iz ovih radova može se zaključiti da o normalnom obrascu DNA metilacije ovisi i obrazac rekombinacije.

DNA metilacija je jedini epigenetički mehanizam za koji je utvrđeno da se reprogramira u embrionalno doba razvoja ženskog ploda kada se i odvija homologna rekombinacija ili izmjena genetičkog materijala (3,31,35,268,269). S obzirom da profaza MI diobe započinje već tijekom embrionalnog razvoja ženskog ploda, pretpostavlja se da su rizični čimbenici majčine majke imali ključnu ulogu u uspostavi obrasca rekombinacije, ali i obrasca DNA metilacije (102,165). Međutim, studije provedene na mlađim majkama djece s DS-om ukazuju na mogućnost da u ovih majki postoji određena genetička predispozicija za nepravilno razdvajanje kromosoma (196,197,210). Analiza kromosoma limfocita periferne krvi majki djece s DS-om mlađih od 35 godina pomoću fluorescentne *in situ* hibridizacije, pokazala je značajno veću frekvenciju mikronukleusa podrijetlom od kromosoma 21 i 13 u odnosu na kontrolnu skupinu (197). Autori sugeriraju da su majke koje su rodile DS dijete prije 35-e godine sklonije nepravilnom razdvajaju kromosoma ne samo u spolnim, već i u somatskim stanicama. Ista grupa autora detektirala je veću učestalost mikronukleusa u prisutnosti *MTHFR* 677T alela što ukazuje da taj polimorfizam utječe na formiranje mikronukleusa u mlađih majki (270). Kao što je već bilo spomenuto, geni uključeni u metabolizam folata su najčešće ispitivani kao rizični čimbenici za nepravilno razdvajanje kromosoma (196,197,210,270). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je u grupi majki s nepravilnim razdvajanjem kromosoma u MI diobi, kombinacija *MTHFR* C677T genotip/prehrana imala veći učinak na globalnu DNA metilaciju (6,2%) nego što je to bio slučaj u svih majki djece s DS-om. Uočili smo jasan trend u kojem su najniže vrijednosti

globalne DNA metilacije imale majke s CT+TT genotipovima i prehranom siromašnom folatima. Stoga je moguće prepostaviti da ova kombinacija upravo djelovanjem na globalnu DNA metilaciju, može doprinjeti nestabilnosti genoma, odnosno nepravilnom razdvajaju kromosoma tijekom MI diobe.

Međutim, neovisno o tome da li se radi o promijenjenom ili normalnom obrascu rekombinacije, rizik za nepravilno razdvajanje kromosoma povećava se sa životnom dobi majke, odnosno trajanjem mejotičkog mirovanja oocite, zbog ubrzane degradacije proteinskih struktura važnih za mejotičku diobu, poput staničnih proteina koji povezuju kromatide i proteina koji su uključeni u građu diobenog vretena (271,272). S povećanjem starosne dobi majke akumulira se utjecaj okolišnih štetnih čimbenika, koji mogu dovesti do promjena u tkivu i funkciji jajnika, te hormonske neravnoteže koja utječe na razvoj jajne stanice, razdvajanje kromosoma i folikularni rast. Također, utvrđeno je da postoje razlike u genskoj ekspresiji između mlađih i starijih oocita, a geni koji su podložni promjenama uslijed godina uključeni su u regulaciju staničnog ciklusa, kontrolu transkripcije, strukturu citoskeleta, proizvodnju energije i odgovor na stres (173-176). Na temelju navedenih podataka moguće je pretpostaviti da je globalna DNA hipometilacija majki kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma 21 u MI diobi rezultat složene interakcije određene genetičke predispozicije kao i djelovanja različitih negativnih čimbenika iz okoline čiji se učinak s godinama povećava. Vjerojatno je da DNA hipometilacija ima važnu ulogu u nerazdvajaju kromosoma, a tome u prilog govore naši rezultati kao i rezultati drugih studija koji ukazuju na povezanost globalne DNA hipometilacije sa starosnom dobi i poremećajima u metabolizmu folata.

U našoj ispitivanoj grupi, majke djece s DS-om kod kojih se dogodilo nepravilno razdvajanje kromosoma tijekom MII diobe imale su niže vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na kontrolnu grupu i razlika je bila statistički značajna, kao i u slučaju MI diobe. Globalna DNA metilacija majki djece s DS-om nije se statistički značajno razlikovala ovisno o mejotičkoj diobi u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma (MI/MII).

Nerazdvajanje kromosoma tijekom MII diobe povezuje se s rekombinacijom u pericentromernom dijelu homolognog para kromosoma 21, koja predstavlja rizik za nerazdvajanje koji je ovisan o godinama života i češće je prisutan u grupi starijih majki (278,279). Neki autori smatraju da je nerazdvajanje u MII diobi zapravo rezultat događaja koji su se odvijali tijekom MI diobe, te da je nerazdvajanje kromosoma u MI i u MII diobi rezultat djelovanja istih rizičnih čimbenika (272). Stoga postoji mogućnost da snižene vrijednosti globalne DNA metilacije nastale uslijed povećanja starosne dobi doprinose nepravilnom razdvajaju kromosoma tijekom MII diobe. S obzirom na činjenicu da je u našem uzorku bilo svega 13 (15%) slučajeva nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 tijekom MII diobe, neophodne su daljnje analize na većem broju ispitanika. Problem malog uzorka vezanog za MII diobu je gotovo univerzalnog karaktera s obzirom da se MII nerazdvajanje kao uzrok trisomije 21 majčinog podrijetla javlja u svega 14%-21% slučajeva DS.

Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om u odnosu na prisustvo CHD

Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om nije se statistički značajno razlikovala ovisno o prisustvu CHD-a u njihove djece s DS-om. U grupi majki djece s DS-CHD⁺ utvrđena su dva prediktora globalne DNA metilacije; BMI i kombinacija MTHFR C677T genotip/prehrana. U grupi majki djece s DS-CHD⁻ nije utvrđen niti jedan čimbenik koji bi statistički značajno utjecao na globalnu DNA metilaciju. Vrijednosti BMI i globalne DNA metilacije su bile u negativnoj korelaciji, odnosno s porastom BMI snižavala se globalna DNA metilacija ($\beta=-0,212$, $P=0,012$). Međutim, globalna DNA metilacija nije se statistički značajno razlikovala ovisno o BMI majki koje su prema preporukama SZO podijeljene na majke normalne tjelesne težine, prekomjerne tjelesne težine, pretile ili pothranjene majke (218).

Brojna istraživanja ukazuju na povezanost između BMI majke i nastanka CHD-a u djeteta, te se smatra da majke koje na početku trudnoće imaju BMI viši od preporučenog prema SZO, imaju statistički značajno veći rizik za nastanak CHD-a u djeteta (279). Mechanizam kojim BMI utječe na razvoj CHD-a nije razjašnjen, ali je utvrđeno da se pretilost

povezuje s nižim koncentracijama folata u krvi, kao i s nedijagnosticiranim dijabetesom, koji se smatraju rizičnim čimbenicima majke za nastanak CHD-a (279-284). Također, nedavno su Hobbs i suradnici utvrdili da pretile majke s *MTHFR* 677 TT genotipom imaju 4,6 puta veći rizik za razvoj CHD-a u djeteta u odnosu na majke normalne tjelesne težine i CC genotipa (285). Iako smo u našem istraživanju utvrdili da je BMI prediktor globalne DNA metilacije i to upravo u majki djece s DS-CHD⁺, ovaj rezultat ne možemo interpretirati kao rizični čimbenik za CHD, jer je u našem istraživanju BMI mјeren u trenutku uzorkovanja, a ne na početku trudnoće, u vrijeme embrionalnog razvoja srca. Međutim, možemo ga komentirati kao čimbenika koji općenito utječe na globalnu DNA metilaciju. Naime, prema nekim autorima, žene u reproduktivnoj dobi s višim BMI-om imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije (97).

U grupi majki djece s DS-CHD⁺ utvrdili smo da je kombinacija *MTHFR* C677T genotip/prehrana određivala gotovo 10% varijabilnosti globalne DNA metilacije. Taj je udio bio znatno veći nego u svim ostalim ispitivanim grupama majki. Iako nije utvrđena statistička značajnost, vidljiv je trend u kojem su najniže vrijednosti globalne DNA metilacije imale majke CT+TT genotipa i prehrane siromašne folatima, a najviše vrijednosti su imale majke CC genotipa i prehrane bogate folatima ($P=0,063$). Može se pretpostaviti da su *MTHFR* 677 CT+TT genotipovi uz prehranu siromašnu folatima statistički značajno povezani s nižim vrijednostima globalne DNA metilacije majki djece s DS-CHD⁺, upravo stoga što predstavljaju čimbenike rizika za nastanak CHD-a. Sve je više dokaza koji upućuju da poremećaji u metabolizmu folata majke doprinose nastanku CHD-a u djeteta, uključujući i CHD u osoba s DS-om (121,125-134,160,285). U istraživanju provedenom na majkama djece s DS-om, *MTHFR* 677T alel je bio utvrđen kao rizični čimbenik za nastanak CHD-a, a rizik je bio veći ukoliko majke nisu perikoncepcijski konzumirale folnu kiselinu (156). Naši, prethodno objavljeni rezultati, ukazuju da *MTHFR* C677T genotip majki djece s DS-om nije rizični čimbenik za nastanak CHD-a u DS djece, ali nismo mogli uzeti u obzir unos pripravaka folata s obzirom da ih ispitanice uglavnom nisu konzumirale u perikoncepcijskom razdoblju (157).

Isti slučaj bio je prisutan i u sadašnjem istraživanju. Protektivni učinak perikoncepcijске primjene folata, uglavnom se odnose na nastanak određenih tipova CHD-a, uključujući konotrunkalne i septalne defekte (121,127,130-134,143). S tim u vezi, zanimljivo je da u našem istraživanju kombinacija *MTHFR* C677T genotip/prehrana imala najveći doprinos na varijabilnost globalne DNA metilacije od čak 15,4% u grupi majki koje su imale djecu s DS-om i septalnim defektom. Utvrđena je povezanost između promijenjenih koncentracija metabolita iz puta folata/homocisteina kao biomarkera metilacije u majki i nastanka CHD-a u djece (151,160). U istraživanje van Driel i suradnika bile su uključene i majke djece s DS-om i CHD-om te je upravo ova grupa ispitanica imala značajno povišene razine ukupnog homocisteina i SAM, te značajno niži omjer SAM/SAH, što ukazuje na globalnu DNA hipometilaciju (160). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da općenito majke djece s DS-om imaju globalnu DNA hipometilaciju, neovisno o tome imaju li njihova djeca CHD ili nemaju. S obzirom da ovakvo istraživanje do sada nije bilo provedeno na majkama djece s DS-om, možemo se osvrnuti jedino na nedavnu studiju Chowdhury i suradnika koji su proveli kvantitativno mjerjenje globalne DNA metilacije limfocita periferne krvi, ali u majki djece s izoliranim CHD-om (77). Utvrdili su da je globalna DNA hipometilacija majki povezana s nastankom izoliranih CHD-a u djeteta, pri čemu su najveće razlike u vrijednosti globalne DNA metilacije, u odnosu na kontrolnu grupu, utvrđene upravo u majki djece sa septalnim defektima. Međutim, razlika u globalnoj DNA metilaciji između majki djece s CHD-om i majki u kontrolnoj grupi je bila manja nego što je to slučaj u studijama koje se bave tumorima. Autori smatraju da su i male razlike u globalnoj DNA metilaciji dovoljne za razvoj prirođenih anomalija, kao što je CHD, s obzirom da su potrebe za metilnim skupinama tijekom embrionalnog razvoja iznimno velike (77, 287, 288).

Iako naši rezultati ukazuju na moguću ulogu globalne DNA hipometilacije na razvoj sindromskog CHD-a, statistički značajna razlika između majki s DS-CHD⁺ i DS-CHD⁻ djecom nije utvrđena. To se može objasniti dvojako, ili se radilo o malom uzorku ili je utjecaj globalne

DNA hipometilacije na razvoj sindromskog CHD-a maskiran, odnosno previše isprepleten s brojnim čimbenicima koji primarno dovode do trisomije 21, odnosno DS-a.

Globalna DNA metilacija u osoba s DS-om

U našem istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u globalnoj DNA metilaciji u ispitanika s DS-om, ovisno o prisutnosti CHD-a. U ovoj grupi ispitanika koja se jedina u našem istraživanju sastojala od pripadnika oba spola, taj se čimbenik pokazao kao statistički značajan prediktor globalne DNA metilacije, s udjelom od 19,1%, ($\beta=-0,437$, $P=0,025$). Iako razlika nije bila statistički značajna, ipak su osobe ženskog spola imale niže vrijednosti globalne DNA metilacije ($P=0,068$). U većini istraživanja u kojima je globalna DNA metilacija određivana kvantifikacijom LINE-1 metilacije u limfocitima periferne krvi, utvrđen je niži status globalne DNA metilacije u osoba ženskog spola, što autori objašnjavaju hormonskim razlikama između spolova, kao i nižim koncentracijama folata u krvi žena uslijed menstrualnog ciklusa (74,86,217). Freeman i suradnici su proveli istraživanje na velikom broju ispitanika s DS-om, te navode veću učestalost CHD-a u ženskog spola nego u muškog spola (173). Do sada nije objavljeno niti jedno istraživanje o globalnoj DNA metilaciji u osoba s DS-om ovisno o prisustvu CHD-a. Međutim, provedena je studija koja se temeljila na analizi koncentracija biomarkera metilacije u krvi ispitanika s CHD-om, a uključivala je i osobe s DS-om (182). Osobe s DS-CHD⁺ su imale višu koncentraciju SAM i SAH te niži omjer SAM/SAH u odnosu na kontrolu, što ukazuje na DNA hipometilaciju. Naši rezultati ukazuju da nema statistički značajne razlike u učestalosti CHD-a ovisno o spolu ispitanika s DS-om. S obzirom na to, mogućnost da niža globalna DNA metilacija u osoba s DS-om ženskog spola ima ulogu u nastanku CHD-a, treba svakako ispitati na većem broju ispitanika.

Interesantan je podatak kojeg su objavili Pogribny i suradnici, a odnosi se na statistički značajno snižene koncentracije homocisteina, metionina, SAM i SAH te povišenu

globalnu DNA metilaciju utvrđenu u ispitanika s DS-om i to u odnosu na njihovu zdravu braću i sestre (289). Iako bez statističke značajnosti, povišene vrijednosti globalne DNA metilacije bile su neočekivani rezultat, te su autori predložili nekoliko objašnjenja. Prvo, moguće je da hipermetilirana DNA predstavlja adaptivni mehanizam koji nastoji suprimirati ekspresiju gena na prekobrojnom kromosmu 21, poput mehanizma kompenzacije doze, odnosno utišavanja gena na jednom od X kromosoma u žena. Drugo, na kromosomu 21 je utvrđen visok udio (46%) hipermetiliranih ponavljajućih elemenata, što se zbog tri kopije kromosoma 21 moglo odraziti na globalnu DNA metilaciju (289,290). Također, na kromosomu 21 se nalazi DNMT3L koji sudjeluje u metilaciji DNA (291). Ponukani ovim radom, ali svjesni da nemamo idealnu grupu za uspoređivanje ipak smo analizirali vrijednosti globalne DNA metilacije u osoba s DS-om u odnosu na njihove majke kao i u odnosu na majke zdrave djece. Utvrdili smo globalnu DNA hipermetilaciju u ispitanika s DS-om. Iako je rezultat zanimljiv i sigurno predstavlja predmet daljnjih istraživanja, valja ipak napomenuti da uspoređivane grupe nisu usklađene s obzirom na spol i starosnu dob za koje je poznato, a i u našem radu potvrđeno, da značajno utječu na vrijednosti globalne DNA metilacije.

6. ZAKLJUČCI

1. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om regularnog tipa majčinog podrijetla je statistički značajno niža nego u majki zdrave djece ($P=0,000$),
2. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om ne razlikuje se ovisno o mejotičkoj diobi u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21 ($P=1,000$),
3. Globalna DNA metilacija u majki djece s DS-om ne razlikuje se u odnosu na prisustvo CHD-a u njihove djece ($P=0,951$),
4. U majki djece s DS-om, vrijednost globalne DNA metilacije statistički značajno ovisi o kombinaciji *MTHFR* C677T genotip/prehrana ($R^2=4,5\%$; $P=0,046$). Majke CT+TT genotipa i prehrane siromašne folatima imaju niže vrijednosti (97,85%; 89,21% - 99,75%) nego majke CC genotipa i prehrane bogate folatima (95,94%; 79,13% - 99,77%). Doprinos ovog čimbenika na varijabilnost globalne DNA metilacije još je veći u majki kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma tijekom MI diobe ($R^2=6,2\%$; $P=0,036$), a najveći udio utvrđen je u majki djece s DS-CHD⁺ ($R^2=9,9\%$; $P=0,026$), i to posebno u majki djece s DS-om i septalnim defektom ($R^2=15,4\%$; $P=0,018$),
5. U majki zdrave djece, starosna dob je jedini prediktor globalne DNA metilacije, i to s udjelom od 6,2% ($P=0,016$). Majke >35 godina imaju statistički značajno niže vrijednosti globalne DNA metilacije u odnosu na mlađe majke ($P=0,003$),
6. Globalna DNA metilacija u ispitanika s DS-om se statistički značajno ne razlikuje ovisno o prisutnosti CHD-a ($P=1,000$), ali ju statistički značajno opisuje spol osobe ($R^2=19,1\%$; $P=0,025$). Ispitanici ženskog spola imaju niže vrijednosti globalne DNA metilacije nego ispitanici muškog spola ($P=0,068$).

7. LITERATURA

1. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 1970;227:561-3.
2. Tollefsbol T. Epigenetics: The new science of genetics. U: Tollefsbol TO, ur. *Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics*. London-Burlington-San Diego: Elsevier, 2011; str 1-6.
3. Morgan HD, Santos F, Green K i sur. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No1:R47-58.
4. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:597-610.
5. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH i sur. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982;10:2709-21.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16: 6–21.
7. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1980;8:499-504
8. Lander ES, Linton LM, Birren B i sur. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409: 860-921
9. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:1412–17.
10. Duncan BK, Miller JH. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 1980;287:560-1.
11. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3740-5.
12. Pogribny IP, Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2249–61.
13. Kile ML, Baccarelli A, Tarantini L, Hoffman E, Wright RO, Christiani DC. Correlation of global and gene-specific DNA methylation in maternal-infant pairs. *PLoS One* 2010;29;5(10):e13730.

14. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI i sur. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethylLight. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6823-36.
15. Weber M, Hellmann I, Stadler MB i sur. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007;39:457–66.
16. Zhu J, He F, Hu S and Yu J. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 2008;24, 481–4.
17. Larsen F, Gundersen G, Lopez R and Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992;13,1095–107.
18. Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 1990;18,3975-82.
19. Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem* 2003;88: 899–910.
20. Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(2):163-76.
21. Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L. Epigenetics and the germline. *Reproduction* 2005; 129(2):137-49.
22. Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* 2009;25:82-90.
23. Morgan HD, Dean W, Coker HA i sur. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 2004;279:52353-60.
24. Patra SK, Patra A, Rizzi F i sur. Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:315-34.
25. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007;447:425-32.
26. Szyf M. The early life environment and the epigenome. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:878-85.

27. Mayer W, Niveleau A, Walter J i sur. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000;403:501-2.
28. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000;9(16):2395-402.
29. Arnaud P. Genomic imprinting in germ cells: imprints are under control. *Reproduction* 2010;140:411-23.
30. Morison IM, Paton CJ, Cleverley SD. The imprinted gene and parent-of-origin effect database. *Nucleic Acids Res* 2001;29:275-6.
31. Hajkova P, Erhardt S, Lane N i sur. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002;117:15-23.
32. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003;262:1-15.
33. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T i sur. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 2008;452:877-881.
34. Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 2004;84:952-60.
35. Lees-Murdock DJ, Walsh CP. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Adv Exp Med Biol* 2008;626:1-15.
36. Bourc'his D, Proudhon C. Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:87-94.
37. Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Duenas-Gonzalez A.. The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics* 2008;9:43-50.
38. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:138-62.
39. Vogt P. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code". *Hum Genet* 1990;84:301-36.
40. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661-73.

41. Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA i sur. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 2003;13:1192-200.
42. Brock GJ, Charlton J, Bird A. Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. *Gene* 1999;240:269-77.
43. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 2007;8:299-309.
44. Allshire RC, Karpen GH. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 2008;9:923-37.
45. Karpen GH, Allshire RC. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* 1997;13:489-96.
46. Hassan KM, Norwood T, Gimelli G, Gartler SM, Hansen RS. Satellite 2 methylation patterns in normal and ICF syndrome cells and association of hypomethylation with advanced replication. *Hum Genet* 2001;109:452-62.
47. Widschwendter M, Jiang G, Woods C i sur. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res* 2004;64:4472-80.
48. Costa FF, Paixao VA, Cavalher FP i sur. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;165:135-43.
49. Hata K, Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 1997;189:227-34.
50. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X i sur. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 2005;24:7213-23.
51. Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima Tl. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol* 2000;30:306-9.
52. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 2003;35:41-8.
53. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 2000;24:363-7.

54. Sandovici I, Kassovska-Bratinova S, Loredo-Osti JC, et al. Interindividual variability and parent of origin DNA methylation differences at specific human Alu elements. *Hum Mol Genet* 2005;14:2135-43.
55. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F i sur. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89(1-2):121-8.
56. Dodge JE, Okano M, Dick F i sur. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem* 2005;280:17986-91.
57. Deng Z, Campbell AE, Lieberman PM. TERRA, CpG methylation and telomere heterochromatin: lessons from ICF syndrome cells. *Cell Cycle* 2010;9:69-74.
58. Bailey SM, Murnane JP. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:2408-17.
59. Buard J, de Massy B. Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots. *Trends Genet* 2007;23:301-9.
60. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:416-24.
61. Mirouze M, Lieberman-Lazarovich M, Aversano R i sur. Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in *Arabidopsis* PNAS 2012;109:5880-5.
62. Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 2001;29:217-22.
63. Kelmenson PM, Petkov P, Wang X, Higgins DC, Paigen BJ, Paigen K. A torrid zone on mouse chromosome 1 containing a cluster of recombinational hotspots. *Genetics* 2005;169:833-41.
64. Mancera E, Bourgon R, Brozzi A, Huber W, Steinmetz LM. High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. *Nature* 2008;454:479-
65. Frediani M, Gelati MT, Maggini F, et al. A family of dispersed repeats in the genome of *Vicia faba*: structure, chromosomal organization, redundancy modulation, and evolution. *Chromosoma* 1999;108:317-24.

66. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 2007;8:272-85.
67. Brouha B, Schustak J, Badge RM i sur. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5280-
68. Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV i sur. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 1997;16:37-43.
69. Asada K, Kotake Y, Asada R i sur. LINE-1 hypomethylation in a choline-deficiency-induced liver cancer in rats: dependence on feeding period. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:171-42.
70. Filkowski JN, Ilnytskyy Y, Tamminga J i sur. Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression. *Carcinogenesis* 2010;31:1110-5.
71. Gray YH. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 2000;16:461-8.
72. Attig L, Gabory A, Junien C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc Nutr Soc* 2010;69:221-31.
73. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N i sur. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics* 2011;6:828-37.
74. Zhu ZZ, Hou L, Bollati V i sur. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol* 2012;41:126-39.
75. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jeffries JL i sur. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 2007;97:1036-46.
76. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF i sur. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10604-9.
77. Chowdhury S, Cleves MA, MacLeod SL i sur. Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91(2):69-76.
78. Lim U, Flood A, Choi SW i sur. Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. *Gastroenterology* 2008;134:47-55.

79. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJM i sur. Folate status, genomic DNA hypomethylation and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology* 2003;124:1240-8.
80. Cash HL, Tao L, Yuan JM i sur. LINE-1 hypomethylation is associated with bladder cancer risk among non-smoking Chinese. *Int J Cancer* 2012;130:1151-9.
81. Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R i sur. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1682-9.
82. Chouliaras L, Rutten BPF, Kenis G i sur. Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2010; 90:498-510.
83. Shimabukuro M, Sasaki T, Imamura A i sur. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: A potential link between epigenetics and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2007; 41:1042-6.
84. Romermann D, Hasemeier B, Metzig K i sur. Global increase in DNA methylation in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2008; 22:1954-6.
85. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD i sur. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 2008; 299:2877-83.
86. Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R i sur. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res* 2010;16:1682-9.
87. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C i sur. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* 2008;9:359-66.
88. Bollati V, Schwartz J, Wright R i sur. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2009 130:234-9.
89. Pilsner JR, Hu H, Ettinger A i sur. Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. *Environ Health Perspect* 2009;117:1466-71.
90. Wright RO, Schwartz J, Wright RJ i sur. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ Health Perspect* 2010;118:790-5.
91. Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P i sur. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect* 2009;117:217-22.

92. Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA i sur. Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environ Health Perspect* 2011;119:977-82.
93. Baccarelli A, Wright RO, Bollati V i sur. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:572-8.
94. Flom JD, Ferris JS, Liao Y i sur. Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:2518-23.
95. Bleich S, Lenz B, Ziegenbein M i sur. Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces downregulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:587-91.
96. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J i sur. Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *Epigenetics* 2011; 6:293-9.
97. Piyathilake C, Badiga S, Johanning G, Alvarez R, Partridge E. Predictors and health consequences of epigenetic changes associated with excess body weight in women of child-bearing age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20:719.
98. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC i sur. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998;128:1204-12.
99. Rampersaud GC, Kauwell GPA, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000;72:998-1003.
100. Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;30;193(3):1184-90.
101. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv Nutr* 2012; 3:21-38.
102. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell Biol* 2003;23:5293-300.
103. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* 2004;62:S3-12; discussion S13.

104. Li D, Pickell L, Liu Y, Wu Q, Cohn JS, Rozen R. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate lead to adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Am J Clin Nutr* 2005;82:188-95.
105. Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 1999; 129:779-782.
106. Frosst P, Blom HJ, Milos R i sur. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
107. Kang SS, Wong PW, Susmano A i sur. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48(3): 536–545.
108. Shelnutt KP, Kauwell JP, Gregory JF i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase 677CRT polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem* 2004;15:554–60.
109. Friso S, Choi SW, Girelli D i sur. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5606–11.
110. Castro R, Rivera I, Ravasco P i sur. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004;41:454–8.
111. Stern LL, Mason JB, Selhub J i sur. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:849–53.
112. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000;151(9):862-77.
113. Dolk H, Loane M, Garne E, et al. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation* 2011;123:841-9.
114. Grech V, Gatt M. Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study. *Int J Cardiol* 1988;68:151-6.

115. Gucer S, Ince T, Kale G, Akcoren Z, Ozkutlu S, Talim B, Caglar M. Noncardiac malformations in congenital heart disease: a retrospective analysis of 305 pediatric autopsies. *Turk J Pediatr* 2005;47:159-66.
116. Linask KK, Huhta J. Folate Protection of Congenital Heart Defects Linked with Canonical Wnt Signaling and Epigenetics *Curr Opin Pediatr* 2010;22(5):561–6.
117. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008;451:943-8.
118. Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis *Cell* 2006;126(6):1037-48.
119. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Rev Genet* 2005;6:826-35.
120. Cardiac embryology website – Toronto general hospital department of anesthesia, perioperative interactive education (last updated October, 2010; cited november 2011). Available from: <http://pie.med.utoronto.ca/HTBG/index.htm>
121. Botto LD, Correa A. Decreasing the burden of congenital heart anomalies: An epidemiologic evaluation of risk factors and survival. *Prog Pediatr Cardiol* 2003;18:111–21.
122. Clark EB. Etiology of congenital cardiovascular malformation: epidemiology and genetics. U: Allen H, Cark E, Gutgesell H, Driscoll D, ur. Moss and Adams' Heart Disease in Infants, Children and Adolescents. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001: str. 64-79.
123. EUROCAT Special Report. The environmental causes of congenital anomalies: a review of the literature (last updated April 2004; cited october, 2012). Available from: <http://www.eurocat-network.eu/content/Special-Report-Env-Risk-I-and-II.pdf>
124. Ferencz C, Loffredo CA, Correa-Villaseñor A, Wilson PD. Genetic and Environmental Risk Factors of Major Cardiovascular Malformations. The Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989, Futura Publishing, Inc: Mount Kisco, New York: 1997.
125. Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2007;115:2995-3014.

126. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;59:536–45.
127. Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD. Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects. Results from a populationbased case-control study. *Pediatrics* 1996; 98: 911-7.
128. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 1999;150(7):675-82.
129. Scanlon KS, Ferencz C, Loffredo CA i sur. Preconceptional folate intake and malformations of the cardiac outflow tract. Baltimore-Washington Infant Study Group. *Epidemiology* 1998 Jan;9(1):95-8.
130. Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation AmJ Med Genet 1996; 62:179–83.
131. Czeizel AE. Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;78:151–61.
132. Czeizel AE, Dobó M, Vargha P. Hungarian cohort controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation shows a reduction in certain congenital abnormalities. *Birth Defects Res Part A*. 2004;70: 853-861.
133. Czeizel AE. Periconceptional folic acid and multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and other congenital abnormalities. *Birth Defects A Clin Mol Teratol* 2009;85(4):260-8.
134. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *Am J Epidemiol* 2000;151:878–84.
135. Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zempleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem* 2005;16:74–7.
136. Hovdenak N, Haram K. Influence of mineral and vitamin supplements on pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;164(2):127-32.
137. EUROCAT Special Report: Prevention of Neural Tube Defects by Periconceptional Folic Acid Supplementation in Europe (last December 2009; cited October, 2012). Available from: <http://www.eurocat-network.eu/content/Special-Report-NTD-3rdEd-Part-I.pdf>

138. Center for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. MMWR. 1992;41:1-7.
139. Medical Research Council: Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. Lancet 1991;338:131-7.
140. EUROCAT (database on Internet) (last updated 2012; cited october, 2012). Available from: <http://www.eurocat-network.eu/preventionandriskfactors/riskfactorsreview>
141. Chivu CM, Brezis M, Tulchinsky TH, Soares-Weiser K, Braunstein R. A systematic review of interventions to increase awareness, knowledge, and folic acid consumption before and during pregnancy. Am J Health Prom 2008;22:237-45.
142. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI i sur. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. N Engl J Med 2007;357:135-42.
143. van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK i sur. Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defect: A registry-based case-control study in the northern Netherlands. Eur Heart J 2010;31:464–71.
144. Ionescu-Ittu R, Marelli AJ, Mackie AS, Pilote L. Prevalence of severe congenital heart disease after folic acid fortification of grain products. Time trend analysis in Quebec, Canada. Brit Med J 2009;338: b1673.
145. Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. N Engl J Med 2000;343:1608-14.
146. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. Nature Reviews Neuroscience 2006;7: 724-31.
147. Chen X, Guo J, Lei Y i sur. Global DNA hypomethylation is associated with NTD-affected pregnancy:A case-control study. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2010;88:575-81.
148. Wang L, Wang F, Guan J i sur. Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects. Am J Clin Nutr 2010;91:1359-1367.
149. Klerk M, Verhoef P, Clarke R i sur. MTHFR 677C →T polymorphism and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. JAMA 2002;288:2023–31.

150. Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H i sur. Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 2001;51:251–4.
151. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005;81:147-53.
152. Zhu WL, Li Y, Yan L i sur. Maternal and offspring MTHFR gene C677T polymorphism as predictors of congenital atrial septal defect and patent ductus arteriosus. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12:51–4.
153. Storti S, Vittorini S, Lascone MR i sur. Association between 5,10 and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:276–80.
154. Galdieri LC, Arrieta SR, Silva CM et al. Homocysteine concentrations and molecular analysis in patients with congenital heart defects. *Arch Med Res* 2007;38:212–8.
155. Verkleij-Hagoort A, Bliek J, Sayed-Tabatabaei F i sur. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: A meta-analysis. *Am J Med Genet* 2007;143A:952–60.
156. Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA i sur. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet* 2009;149A:2080–87.
157. Babić Božović I, Vraneković J, Starčević-Čizmarević N, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Ped Int* 2011;53:546–50.
158. van Beijnum IM, den Heijer M, Kapusta L, Blom HJ. The *MTHFR* 677C-T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis. *QMJ* 2007;100:743-53.
159. Yin M, Dong L, Zheng J i sur. Meta Analysis of the Association between *MTHFR* C677T Polymorphism and the Risk of Congenital Heart Defects. *Annals of Human Genetics* 2012;76:9–16.
160. van Driel LM, de Jonge R, Helbing WA i sur. Maternal global methylation status and risk of congenital heart diseases. *Obstet Gynecol* 2008;112:277-83.

161. Kapusta L, Haagmans ML, Steegers EA, Cuypers MH, Blom HJ, Eskes TK. Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediatr* 1999;135:773-4.
162. van der Put NM, Van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 2006;226:243-70.
163. Clark EB. Pathogenetic mechanisms of congenital cardiovascular malformations revisited. *Semin Perinatol* 1996;20:465-72.
164. Conti A, Fabbrini F, D'Agostino P i sur. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics* 2007;8:268.
165. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011;2(6):607-17.
166. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009;10(5):295-304.
167. Vallaster M, Vallaster CD, Wu SM. Epigenetic mechanisms in cardiac development and disease. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012;44(1):92-102.
168. Gardiner K, Davisson M. The sequence of human chromosome 21 and implications for research into Down syndrome. *Genome Biol* 2000;1:REVIEWS0002.
169. Ait Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L i sur. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007;81:475-91.
170. Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, et al. Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum Mol Genet* 2007;16:774-82.
171. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Acad Sci* 1959;248:602-3.
- 172 Tofts CP, Christianson RE. Anomalies in Down syndrome individuals in a large populations-based registry. *Am J Med Genet* 1998;77:431-8.

173. Freeman SB, Bean LH, Allen EG i sur. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genetics in Medicine* 2008;10:173–80.
174. Korenberg JR, Chen XN, Schipper R i sur. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):4997-5001.
175. Shapiro BL. Down syndrome: A disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* 1983;14:241–69.
176. Reeves RH. Down's syndrome. A complicated genetic insult. *Lancet* 2001;358 Suppl:S23.
177. Shapiro BL. Whither Down syndrome critical regions? *Hum Genet* 1997;99:421-3.
178. Patterson D. Genetic mechanisms involved in the phenotype of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007;13(3):199–206.
179. Epstein CJ. The consequences of chromosome imbalance. *Am J Med Genet Suppl* 1990;7:31-7.
180. Epstein CJ. Mechanisms of the effects of aneuploidy in mammals. *Annu Rev Genet* 1988;22:51-75.
181. FitzPatrick DR. Transcriptional consequences of autosomal trisomy: primary gene dosage with complex downstream effects. *Trends Genet* 2005;21:249-53.
182. Obermann-Borst SA, van Driel LM, Helbing WA i sur. Congenital heart defects and biomarkers of methylation in children: a case-control study. *Eur J Clin Invest* 2011;41(2):143-50.
183. Vraneković J, Babić Božović I, Grubić Z i sur. Down Syndrome: Parental Origin, Recombination, and Maternal Age. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16(1):70-3.
184. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL i sur. The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep* 2007;122(1):62-72.
185. Marston AL, Tham WH, Shah H, Amon A. A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* 2004; 303:1367-1370.

186. Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:700-708.
187. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:45-58.
188. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:266-272.
189. Allen EG, Freeman SB, Druschel C i sur. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum Genet* 2009; 125:41-52.
190. Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A i sur. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996; 14:400-405.
191. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trend Genet* 2008; 24:86-93.
192. Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 2008; 651:14-29.
193. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985;70:11-7.
194. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP i sur. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
195. Zintzaras E. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2007;52:943-53.
196. Coppede F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutat Res* 2009; 682:54-70.
197. migliore F, Grossi E, Miglieli F, et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. *BMC Med Genomics* 2010;3:42.

198. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P i sur. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet 2000;67:623-30.
199. Meguid NA, Dardir AA, Khass M, Hossieny LE, Ezzat A, El Awady MK. MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian mothers with Down syndrome children. Dis Markers 2008;24:19-26.
200. Wang SS, Qiao FY, Feng L, Lv JJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. J Zhejiang Univ Sci B 2008; 9:93-9.
201. Sheth JJ, Sheth FJ. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. Indian Pediatr 2003;40:115-23.
202. Coppedè F, Marini G, Bargagna S i sur. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. Am J Med Genet A 2006;140:1083-91.
203. Takamura N, Kondoh T, Ohgi S i sur. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. Eur J Nutr 2004; 43:285-287.
204. Chadeffaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jais J, Kamoun P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. Pediatr Res 2002; 51:766-767.
205. Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR i sur. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. Eur J Hum Genet 2002; 10:388-390.
206. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G i sur. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. Am J Med Genet A 2003; 121A:219-224.
207. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C i sur. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. Br J Nutr 2005;94:166-9.
208. Scala I, Granese B, Sellitto M i sur. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. Genet Med 2006; 8:409-416.

209. Martinez-Frias ML, Perez B, Desviat LR i sur. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet A* 2006; 140:987-997.
210. Coppede F, Micheli F, Bargagna S i sur. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett* 2009; 449:15-19.
211. Pozzi E, Vergani P, Dalprà L i sur. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:636.e1-6.
212. Vranekovic J, Babic Bozovic I, Starcevic Cizmarevic N i sur. Functional inference of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on enzyme stability as a potential risk factor for Down syndrome in Croatia. *Dis Markers* 2010;28:293-8.
213. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K i sur. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;15;28(8):E32.
214. Zeschchnigk M, Böhringer S, Price EA, Onadim Z, Maßhöfer L, Lohmann DR. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus *Nucl Acids Res* 2004;32(16):e125
215. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M i sur. Precision and performance characteristics of sodium bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 2006;8:209–17.
216. Richards KL, Zhang B, Baggerly KA i sur. Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One* 2009;4:e4941.
217. Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA i sur. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:108-14.
218. World Health Organization (database on Internet), (last updated 2012; cited october, 2012). Available from: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
219. Pogribny IP, Vanyushin BF. Age-Related Genomic Hypomethylation. U: Epigenetics of Aging, ur. Tollesbol TO. Springer; 2009, str. 11-27.

220. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A i sur. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 2006;9:199-207.
221. Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 2008;299:1345–50.
222. Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8:268-76.
223. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457-63.
224. Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2406S-2409S.
225. Richardson B. DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immunol* 2003;109:72-9.
226. Iraola-Guzmán S, Estivill X, Rabionet R. DNA methylation in neurodegenerative disorders: a missing link between genome and environment? *Clin Genet* 2011;80:1–14.
227. Wilson VL, Smith RA, Ma S i sur. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 1987;262:9948-51.
228. Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr* 2002;132:2401S-2405S.
229. Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem* 2002;84(2):324-34.
230. Casillas MA, Jr., Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2003;252(1-2):33-43.
231. Cerdà S, Weitzman SA. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat Res* 1997;386(2):141-52.
232. Pogribny IP, Tryndyak VP, Boureiko A i sur. Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res* 2008;644(1-2):17-23.

233. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7:33-42.
234. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM i sur. *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 202;107:151–5.
235. Kohli U, Arora S, Kabra M, Ramakrishnan L, Gulati S, Pandey RM. Prevalence of *MTHFR* C677T polymorphism in north Indian mothers having babies with Trisomy 21 Down syndrome *Downs Syndr Res Pract* 2008;12:133–7.
236. James JS. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: Beyond genetics. *Am J Med Genet* 2004;127A:1–4.
237. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999;129:919-22.
238. Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6:359-65.
239. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA i sur. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003;101:2483-8.
240. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT i sur. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011; 26:125-132.
241. Moores CJ, Fenech M, O'Callaghan NJ. Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229:76-88.
242. Matsuzaki K, Deng G, Tanaka H, Kakar S, Miura S, Kim YS. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8564-8569.
243. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation .*Science* 2003;18:300-455.

244. Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E i sur. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* 2006;66:8462-9468.
245. Wilson IM, Davies JJ, Weber M i sur. Epigenomics: mapping the methylome. *Cell Cycle* 2006;5:155-8.
246. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D i sur. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999;402:187-91.
247. Sakuno T, Watanabe Y. Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Res.* 2009; 17:239-249.
248. Gopalakrishnan S, Sullivan BA, Trazzi S, Della Valle G, Robertson KD. DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* 2009; 18:3178-3193.
249. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004;431:96–9.
250. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H i sur. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001;107:323–37.
251. De La Fuente R, Baumann C, Fan T, Schmidtmann A, Dobrinski I, Muegge K. Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1448-54.
252. Pidoux AL, Allshire RC. The role of heterochromatin in centromere function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:569–79. 59.
253. Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 2004;431:364–70.
254. Weaver BA, Cleveland DW. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:10103–5.
255. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Rev Genet* 2001;2:280–91.
256. Sullivan BA, Blower MD, Karpen GH. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nature Rev Genet* 2001;2:584–96.

257. Mellone BG, Allshire RC. Stretching it: putting the CEN(P-A) in centromere. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:191–8.
258. Warburton PE. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res* 2004;12:617–26.
259. Choo KH. Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev Cell* 2001;1:165–177.
260. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2008;10:228-36.
261. Yehezkel S, Segev Y, Viegas-Péquignot E, Skorecki K, Selig S. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum Mol Genet* 2008;17:2776-89.
262. Lamb NE, Feingold E, Savage A i sur. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1391-1399.
263. Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:250-255.
264. Sigurdsson MI, Smith AV, Bjornsson HT, Jonsson JJ. HapMap methylation-associated SNPs, markers of germline DNA methylation, positively correlate with regional levels of human meiotic recombination. *Genome Res* 2009;19:581-9.
265. Qu G, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:34–9.
266. Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H i sur. Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13580–5.
267. Cadieux B, Ching TT, Vandenberg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* 2006;66:8469–76.
268. Obata Y, Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 2002;277:5285-9.

269. Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet* 2003;12:2873-9.
270. Coppede F, Colognato R, Bonelli A i sur. Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:2006-2015.
271. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985; 70:11-17.
272. Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE. Risk factors for nondisjunction of trisomy 21 *Cytogenetic Genome Res* 2005;111:273–80.
273. Hamatani T, Falco G, Carter MG i sur. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2263-2278.
274. Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T i sur. Aging of oocyte, ovary, and human reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:117-131.
275. Steuerwald NM, Steuerwald MD, Mailhes JB. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Mol Hum Rep* 2005; 11:623-630.
276. Pan H, Ma P, Zhu W, Schultz RM. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* 2008; 316:397-407.
277. Oliver TR, Feingold E, Yu K i sur. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet* 2008; 14: 4.
278. Ghosh S, Feingold E, Dey SK. Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations. *Am J Med Genet A* 2009; 149A:1415-1420.
279. Stothard KJ, Tennant PG, Bell R, Rankin J. Maternal Overweight and Obesity and the Risk of Congenital Anomalies: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2009;301:636-50.
280. Towner D, Kjos SL, Leung B i sur. Congenital malformation in pregnancies complicated by NIDDM: increased risk from poor maternal metabolic control but not from exposure to sulfonylurea drugs. *Diabetes Care*. 1995;18:1446-51.

281. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based casecontrol study. *Pediatrics* 1990;85:1-9.
282. Casanueva E, Drijanski A, Fernandez-Gaxiola AC, Meza C, Pfeffer F. Folate deficiency is associated with obesity and anemia in Mexican urban women. *Nutr Res* 2000;20:1389-94.
283. Hötzl D. Suboptimal nutritional status in obesity (selected nutrients). *Bibl Nutr Dieta* 1986;37:36-41.
284. Gallistl S, Sudi K, Mangge H, Erwa W, Borkenstein M. Insulin is an independent correlate of plasma homocysteine levels in obese children and adolescents. *Diabetes Care* 2000;23:1348 –52
285. Shaw CA, Cleves MA, Karim MA, Zhao W, MacLeod SL. Maternal folaterelated gene environment interactions and congenital heart defects. *Obstet Gynecol* 2010;116:316-22.
286. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005;81:147-53.
287. Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:993-1016.
288. Bruinse HW, van den Berg H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;61:31-7.
289. Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I. Homocysteine Metabolism in Children with Down Syndrome: In Vitro Modulation. *Am J Hum Genet* 2001;69:88–95.
290. Yu J, Tong S, Shen Y, Kao FT. Gene identification and DNA sequence analysis in the GC-poor 20 megabase region of human chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6862–7.
291. Aapola U, Shibuya K, Scott HS i sur. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* 2000;65:293–8.

8. PRILOZI

PRILOG 1: Anketini upitnik

OSOBNI PODATCI ISPITANIKA

PODATCI KOJI SE ODNOSE NA MAJKU

ime i prezime: _____

mjesto i datum rođenja: _____

adresa prebivališta: _____

stručna spremna/zanimanje: _____

kronične bolesti: NE DA (navesti koje?) _____

ukupan broj poroda (koja je po redu bila ova trudnoća): _____

dob majke u vrijeme poroda: _____

pušenje: NE DA: prije trudnoće/prije i tijekom trudnoće/u trenutku anketiranja

alkohol: NE DA: prije trudnoće/prije i tijekom trudnoće/u trenutku anketiranja

lijekovi: NE DA : prije trudnoće/prije i tijekom trudnoće /u trenutku anketiranja

tj. visina _____ cm

tj. težina _____ kg (prije trudnoće) tj. težina _____ kg (u trenutku anketiranja)

konzumiranje pripravaka folne kiseline:

NE

DA (kojih _____)

a) od 4. tjedna prije trudnoće do 8. tjedna trudnoće

b) od 6. tjedna trudnoće do 12. tjedna trudnoće

c) ostalo (kada _____)

konzumiranje vitaminsko-mineralnih pripravaka: NE DA (kojih i kada _____)

Prehrana:

1. mediteranska

2. kontinentalna

3. miješana (mediteransko-kontinentalna)

4. vegetarijanska (navesti vrstu _____)

Promjene u prehrani prije i tijekom trudnoće: NE DA (koje _____)

Učestalost konzumiranja namirnica bogatih folatima

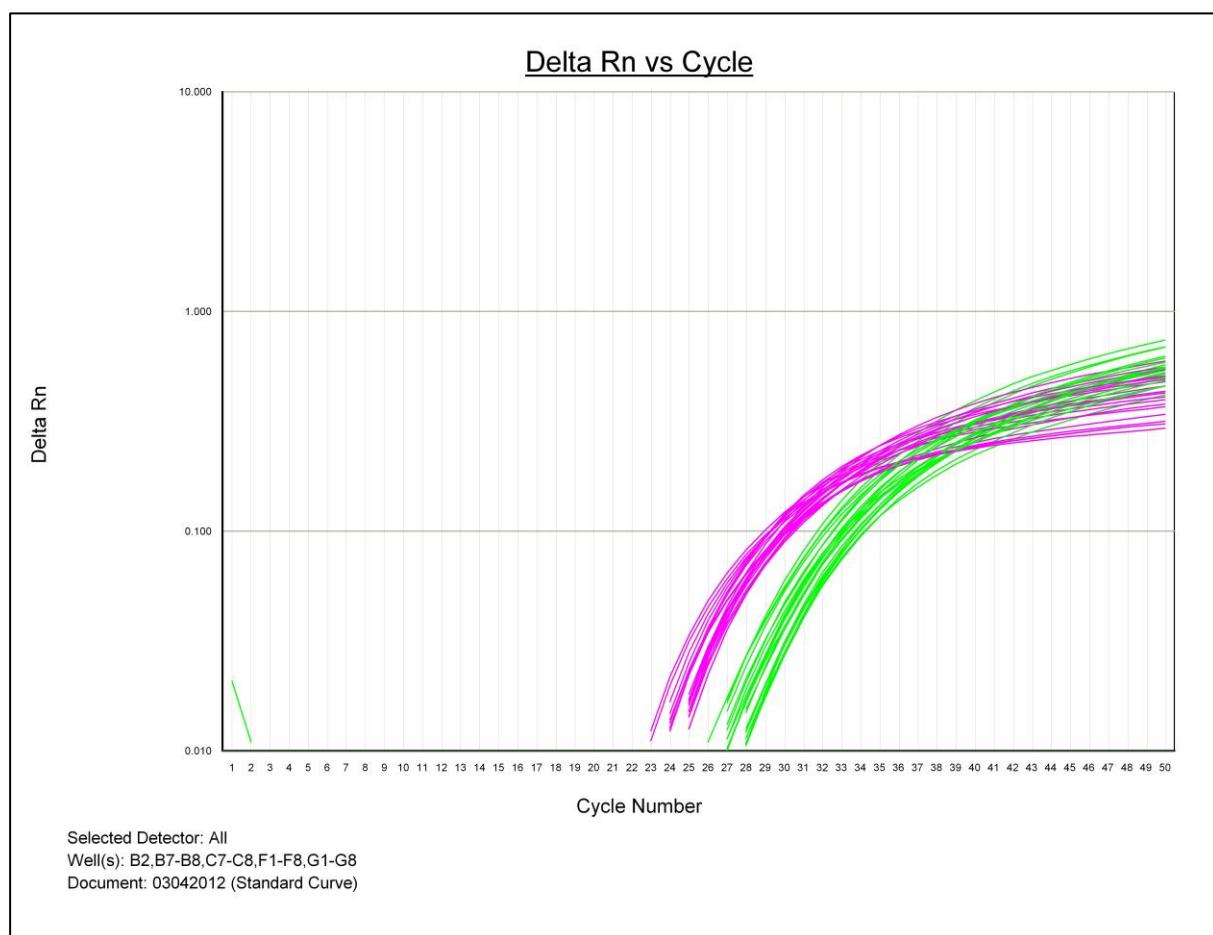
	nikada	jednom mjesečno	2-3 puta mjesečno	jednom tjedno	2-3 puta tjedno	svaki dan
salate						
zeleno lisnato povrće						
mahunarki						
teleća jetra						
voće*						
corn flakes; müesle						

* posebno naranče i jagode

Mjesto i datum _____

PRILOG 2: Metoda MethyLight za LINE-1 sekvene – prikaz reprezentativnih krivulja amplifikacije metiliranih (ružičasta) i nemetiliranih (zelena) LINE-1 sekvenci cjelokupnog genoma ispitanika.

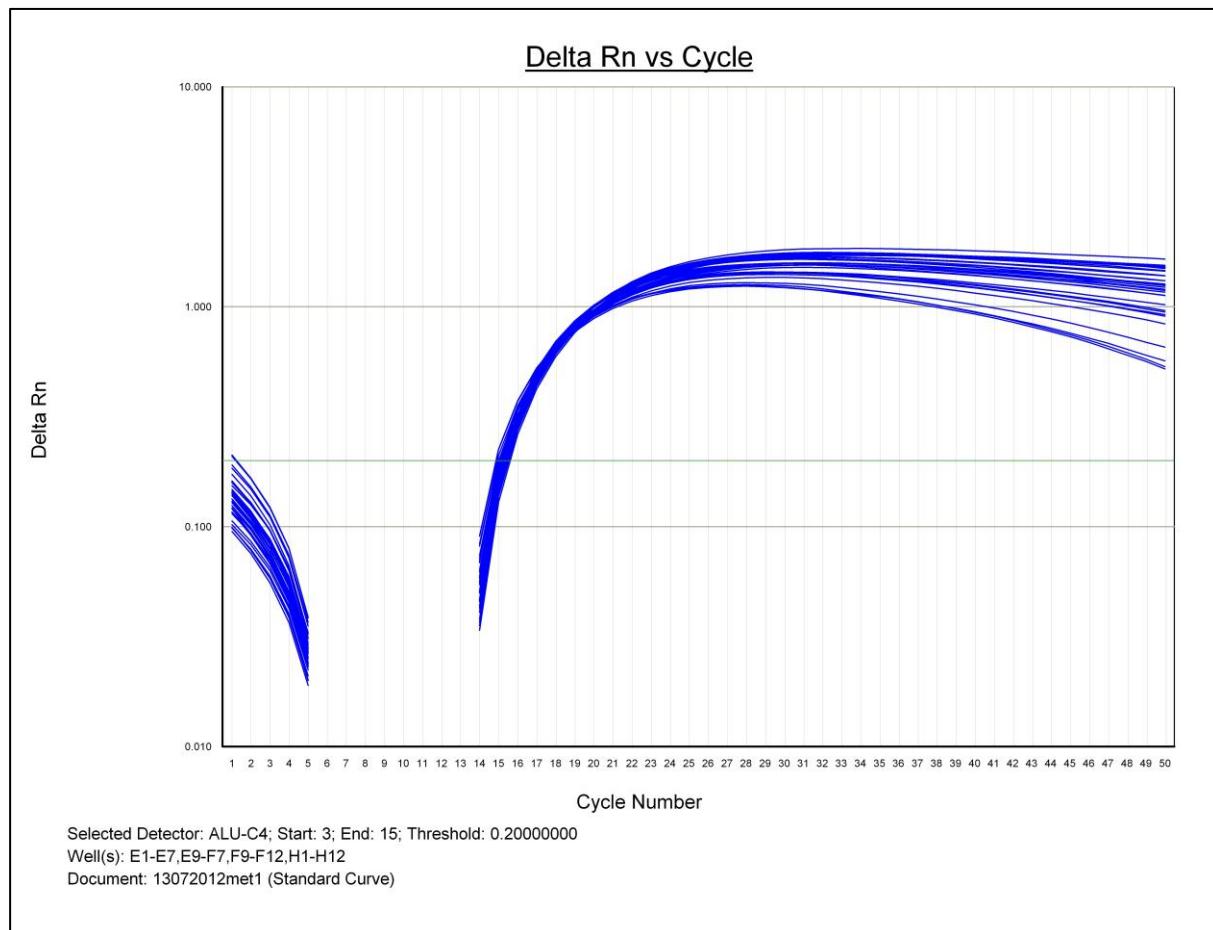
Standardna krivulja pokazuje porast logaritamske vrijednosti fluorescencije detektora koja se mjeri tijekom oslobođanja sa ciljne sekvene prilikom amplifikacije ciljne sekvene u realnom vremenu TaqMan MGB probama na platformi ABI 7500 ReaLTime PCR System.



X ordinata: broj PCR ciklusa; Y ordinata: delta Rn (intenzitet fluorescencije)

PRILOG 3: Metoda MethyLight za ALU-C4 sekvence – prikaz reprezentativnih krivulja amplifikacije ALU-C4 sekvenci cjelokupnog genoma ispitanika.

Standardna krivulja pokazuje porast logaritamske vrijednosti fluorescencije detektora koja se mjeri tijekom oslobađanja sa ciljne sekvence prilikom amplifikacije ciljne sekvence u realnom vremenu TaqMan MGB probama na platformi ABI 7500 RealTime PCR System.



X ordinata: broj PCR ciklusa; Y ordinata: delta Rn (intenzitet fluorescencije)

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Ivana Babić Božović
Adresa	Vjeneceslava Novaka 14, 51 000 Rijeka
Telefon	051 651 291
Telefaks	051 678 896
Električna pošta, Web adresa	Ivana.Babic@medri.uniri.hr www.medri.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	06.11.1978.
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	279 280

RADNO ISKUSTVO

• Datumi (od – do)	2004. – 2005.
Ustanova zaposlenja	Klinički bolnički centar Rijeka
Naziv radnog mjesta	doktor medicine
Funkcija	stažist
Područje rada	klinička medicina
• Datumi (od – do)	2005. – 2006.
Ustanova zaposlenja	Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Naziv radnog mjesta	stručni suradnik
Funkcija	asistent
Područje rada	citogenetika / prenatalna diagnostika nastava iz citologije, molekularne biologije
• Datumi (od – do)	2006.
Ustanova zaposlenja	Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Naziv radnog mjesta	znanstveni novak
Funkcija	asistent
Područje rada	citogenetika / prenatalna diagnostika Molekularna genetika, nastava iz citologije, molekularne biologije i medicinske genetike

ŠKOLOVANJE

Datum	2004.
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Zvanje	doktor medicine

USAVRŠAVANJE

Godina	2006.
Mjesto	South Tyrol, Italy
Ustanova	Goldrain Castle
Područje	Klinička humana citogenetika
Godina	2006.
Mjesto	Zagreb

Ustanova	Institut Ruđer Bošković
Područje	Metodološki tečajevi u biologiji i medicini „DNA and RNA“
Godina	2007.
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Područje	Znanstvenoistraživačka metodologija
Godina	2008.
Mjesto	Split
Ustanova	ESGM Remote Training Center of Split
Područje	Hybrid Course in Non-Invasive Prenatal Diagnosis

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik	Hrvatski
-----------------	----------

Strani jezici

Jezik	Engleski
Govori	da
Piše	da
Čita	da

SOCIJALNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Timski rad i suradnja s kolegama, komunikacija s pacijentima, edukacija studenata, oralne prezentacije, kontinuirano učenje

ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Organizacija nastave, rada sa studentima, te laboratorijskog rada.
--

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Dijagnostički i istraživački rad u molekularnom i citogenetičkom laboratoriju, efikasno korištenje računala, interneta i korisničkih programa standardnog Microsoft Office paketa, pretraživanje baza podataka.

VOZAČKA DOZVOLA

Kategorija B, 1998.

DODATNI PODATCI

Suradnik na znanstvenim projektima
0062017- Brajenović Milić Bojana: PRENATALNI TEST PROBIRA ZA DOWNOV SINDROM I OŠTEĆENJE NEURALNE CIJEVI
062-0000000-1349 - Brajenović Milić Bojana: PRENATALNI PROBIR ZA SINDROM DOWN
Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Current Contens:
Babić I, Brajenović-Milić B, Petrović O, Mustać E, Kapović M. Prenatal diagnosis of complete trisomy 19q. Prenat Diagn 2007;27: 644-7.
Brajenović-Milić B, Babić I, Ristić S, Vraneković J, Brumini G, Kapović M. Pregnant women's attitudes towards amniocentesis before receiving Down syndrome screening results. Women's Health Issues 2008;18(2):79-84.

Vraneković J, Brajenović-Milić B, Modrusan-Mozetić Z, Babić I, Kapović M. Severe psychomotor retardation in a boy with a small supernumerary marker chromosome 19p. *Cytogenet Genome Res* 2008;121:298-301.

Babić Božović I, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B. *MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome*. *Ped Int* 2001;53:546-50.

Vraneković J, Babić Božović I, Starčević Čizmarević N, Buretić-Tomljanović A, Ristić S, Petrović O, Kapović M, Brajenović- Milić B. Functional inference of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on enzyme stability as a potential risk factor for Down syndrome in Croatia. *Dis markers* 2010;28:293-8.

Malnar M, Košiček M, Bene R, Petek Tarnik I, Pavelin S, Babić I, Brajenović-Milić B, Hećimović H, Titlić M, Trkanjec Z, Demarin V, Hećimović S. Use of cerebrospinal fluid biomarker analysis and apolipoprotein E genotyping for improving Alzheimer's disease diagnosis in a non-specialized setting. *Acta Neurobiol Exp* 2012;72:264-71.

Vraneković J, Božović IB, Grubić Z, Wagner J, Pavlinić D, Dahoun S, Bena F, Culić V, Brajenović-Milić. Down Syndrome; Parental Origin, Recombination, and Maternal Age. *B.Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16:70-73.

SUDJELOVANJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA:

Babić I, Brajenović-Milić B, Petrović O, Mustać E, Kapović M. 2007. Prenatal diagnosis of complete trisomy 19q. *Chromosome Res* 15 (Suppl 1): 29-30.

Vraneković J, Brajenović-Milić B, Babić Božović I, Peterlin B, Mustać E, Kapović M, Riegel M. (2009). De novo balanced translocation t(18;20)(q21.3;q12) in a mentally retarded girl. *Chromosome Res* 17 (Suppl 1): S49-S49.

SUDJELOVANJE NA DOMAĆIM SKUPOVIMA:

Usmeno izlaganje:

Brajenović-Milić B, Babić I, Ristić S, Vraneković J, Brumini G, Kapović M. (2007). Pregnant women's attitudes towards amniocentesis before receiving Down syndrome screening results. Knjiga sažetaka 4. hrvatskog kongresa iz humane genetike u:Paediatrics Croatica / Barišić, Ingeborg (ur.). Klinika za dječje bolesti Zagreb. 127-127

Babić Božović, Ivana; Vraneković, Jadranka; Starčević Čizmarević, Nada; Mahulja-Stamenković, Vesna; Prpić, Igor; Brajenović-Milić, Bojana. *MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome*. The seventh ISABS conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo clinic lectures in translational medicine. Zagreb : ISABS, 2011. 241-241

Poster prezentacija:

Babić I, Brajenović-Milić B, Petrović O, Mustać E, Kapović M. Prenatal diagnosis of complete trisomy 19q u: Barišić I, ur. Knjiga sažetaka 4. hrvatskog kongresa iz humane genetike u: Paediatrics Croatica. Zagreb: Klinika za dječje bolesti, 2007; str.156-156.

Sudjelovanje u izvođenju nastave iz kolegija:

1. MEDICINSKA BIOLOGIJA na sveučilišnom studiju MEDICINE
2. MEDICINSKA GENETIKA na sveučilišnom studiju MEDICINE
3. STANIČNA BIOLOGIJA S GENETIKOM na sveučilišnom studiju STOMATOLOGIJE
4. HUMANA GENETIKA na stručnom studiju MEDICINSKO-LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE
4. PRIRODOSLOVLJE na sveučilišnom UČITELJSKOM studiju

Suautorstvo skripata:

Kapović M, Radojčić A, Brajenović- Milić B, Ristić S, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Babić I, Nadalin S.: Biologija – sažeci vježbi i seminara za studente sanitarnog inženjerstva. Izd. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2006

Kapović M, Radojčić A, Brajenović- Milić B, Ristić S, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Babić I, Nadalin S.: Medicinska biologija - sažeci vježbi i seminara za studente medicine. Izd. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2006.

Kapović M, Radojčić A, Brajenović- Milić B, Ristić S, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Babić I, Nadalin S.: Stanična biologija s genetikom - sažeci vježbi i seminara za studente stomatologije. Izd. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2006.

Članstva:

Hrvatska liječnička komora,
Hrvatsko društvo za humanu genetiku,
European Cytogenetics Assosiation.