

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ŠKAPIN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ŠKAPIN

**VLOGA POLIMORFIZMOV V GENIH ZA IZBRANE
METILTRANSFERAZE PRI NASTANKU PRIROJENIH
SRČNIH NAPAK**

**INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN SELECTED
METHYLTRANSFERASE GENE ON CONGENITAL
HEART DISEASE DEVELOPMENT**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinični biokemijo pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici doc. dr. Nataši Karas Kuželički, mag. farm. za strokovne nasvete, usmerjanje, podporo in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvala gre tudi somentorici asist. dr. Alenki Šmid, mag. farm., za strokovno pomoč pri opravljanju raziskovalnega dela magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi vsem mojim domačim za podporo, potrpežljivost in vzpodbudne besede med samim študijem in pisanjem magistrske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm., in somentorstvom asist. Dr. Alenke Šmid, mag. farm. Naloga je del projekta Analiza bioloških označevalcev presnove folatov pri ugotavljanju tveganja za nastanek napak nevralne cevi in prirojenih okvar srca (šifra projekta: J3-5507), pod vodstvom prof. dr. Ksenije Geršak, dr. med.

Ana Škapin

Ljubljana, september 2017

Komisija za zagovor:

Predsednica komisije: izr. Prof. dr. Mojca Kerec - Kos, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

Somentorica: asist. dr. Alenka Šmid, mag. farm.

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

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	II
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
KAZALO GRAFOV	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD.....	1
1.1 SRCE	1
1.2 ZGRADBA SRCA.....	1
1.2.1 SRČNE ZAKLOPKE	1
1.3 KRVNI OBTOK	2
1.4 PRIROJENE SRČNE NAPAKE	3
1.4.1 RAZLIKOVANJE PRIROJENIH SRČNIH NAPAK.....	4
1.5 FOLNA KISLINA	6
1.5.1 ABSORPCIJA FOLATOV	6
1.5.2 PRESNOVA FOLATOV	7
1.6 METILTRANSFERAZE	9
1.6.1 BETAIN-HOMOCISTEIN S-METILTRANSFERAZA	10
1.6.2 GLICIN N-METILTRANSFERAZA.....	11
1.6.3 DNA METILTRANSFERAZA 3B	12
2. NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1 PREISKOVANCI	15
3.2 POSTOPKI RAZISKAVE.....	15
3.3 REAGENTI IN OPREMA.....	16
3.3.1 REAGENTI ZA IZOLACIJO DNA.....	16
3.3.2 APARATURE IN MATERIALI ZA IZOLACIJO DNA	16

3.3.3 APARATURE IN REAGENTI ZA MERITEV KONCENTRACIJE DNA IN REDČENJE VZORCEV	16
3.3.4 REAGENTI ZA GENOTIPIZACIJO.....	17
3.3.5 APARATURE IN MATERIALI ZA GENOTIPIZACIJO	17
3.3.6 DRUGI APARATI	17
3.4 IZOLACIJA DNA	18
3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA.....	19
3.6 GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI	19
3.7 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	24
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1 PORAZDELITEV PODATKOV	25
4.2 UNIVARIANTNA STATISTIČNA ANALIZA	26
4.2.1 STAROST MATERE OB ZANOSITVI	26
4.2.2 VIŠINA MATERE	28
4.2.3 TEŽA MATERE	29
4.2.4 ŠTEVILO NOSEČNOSTI.....	29
4.2.5 ŠTEVILO ŽIVOROJENIH OTROK	30
4.2.6 ŠTEVILO SPLAVOV	30
4.2.7 MESEČNI VNOS METIONINA	30
4.2.8 MESEČNI VNOS FOLNE KISLINE S HRANO	31
4.2.9 BMI.....	31
4.2.10 KAJENJE	32
4.2.11 IZOBRAZBA MATERE.....	34
4.2.12 DRUŽINSKA ANAMNEZA	35
4.2.13 SPOL OTROKA.....	35
4.2.14 GESTACIJSKI DIABETES	36
4.2.15 DRUGE KRONIČNE BOLEZNI PRI MATERI	37
4.2.16 PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA V NOSEČNOSTI	38
4.2.17 DRUGA ZDRAVILA MED NOSEČNOSTJO.....	38
4.2.18 PRISOTNOST ZVIŠANE TELESNE TEMPERATURE PRI MATERI V 1. TRIMESEČJU NOSEČNOSTI	39
4.2.19 UPORABA SAVNE V 1. TRIMESEČJU NOSEČNOSTI.....	39

4.2.20 VNOS PRIPRAVKOV S FOLATI	40
4.2.21 VNOS DRUGIH PREHRANSKIH DODTAKOV	41
4.2.22 ANALIZA GENOTIPOV IZBRANIH METILTRANSFERAZ	42
4.3 ANALIZA PODATKOV Z LOGISTIČNO REGRESIJO	44
5. SKLEPI.....	49
6. LITERATURA	50
7. PRILOGE	i
7.1 PRILOGA 1	i
7.2 PRILOGA 2	x
7.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	xvii

KAZALO SLIK

SLIKA 1: Srčne zaklopke (2).	1
SLIKA 2: Krvni obtok (2).	2
SLIKA 3: Kemijska struktura folne kisline (11).	6
SLIKA 4: Presnova folatov (14).....	9
SLIKA 5: Prikaz genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami (30).	21

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: Podatki o uporabljenih reagentih TaqMan®.	22
PREGLEDNICA 2: Normalnost porazdelitve testiranih spremenljivk (Shapiro-Wilkov test).	25
PREGLEDNICA 3: Podatki za KS in TS za spremenljivko starost matere ob zanositvi. ..	26
PREGLEDNICA 4: Rezultati statistične analize nenormalno porazdeljenih spremenljivk (Mann-Whitneyjev U test).....	28
PREGLEDNICA 5: Razlike v kadilskem statusu matere v kontrolni in testni skupini.	32
PREGLEDNICA 6: Kajenje v času nosečnosti v kontrolni in testni skupini.....	32
PREGLEDNICA 7: Razlike v stopnji izobrazbe matere med KS in TS.	34
PREGLEDNICA 8: Družinska anamneza prirojenih srčnih napak v KS in TS.	35
PREGLEDNICA 9: Razlike v spolu otroka med TS in KS.	35

PREGLEDNICA 10: Razlike v pojavnosti gestacijskega diabetesa med KS in TS.	36
PREGLEDNICA 11: Prisotnost kronične bolezni pri materi v KS in TS.	37
PREGLEDNICA 12: Jemanje protiepileptičnih zdravil v nosečnosti v KS in TS.	38
PREGLEDNICA 13: Jemanje drugih zdravil v nosečnosti v KS in TS.	38
PREGLEDNICA 14: Prisotnost zvišane telesne temperature pri materi v 1. trimesečju nosečnosti v KS in TS.	39
PREGLEDNICA 15: Uporaba savne v začetku nosečnosti v KS in TS.	39
PREGLEDNICA 16: Razlike v vnosu folatnih pripravkov med KS in TS.	40
PREGLEDNICA 17: Vnos multivitaminskih, mineralnih in omega 3 prehranskih dodatkov v KS in TS.	41
PREGLEDNICA 18: Analiza aditivnega modela genotipov mater in otrok KS in TS.	42
PREGLEDNICA 19: Analiza dominantnega modela genotipov mater in otrok KS in TS.	43
PREGLEDNICA 20: Analiza recesivnega modela genotipov mater in otrok KS in TS.	43
PREGLEDNICA 21: Osnovni model logistične regresije brez genotipskih podatkov.	45
PREGLEDNICA 22: Najustreznejši končni model logistične regresije, ki vključuje okoljske in genetske dejavnike tveganja.	46

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: Razsevni diagram - genotipizacija v končni točki za polimorfizem BHMT rs3733890.	23
GRAF 2: Starost matere ob zanositvi v TS in KS. Točke prikazujejo povprečne vrednosti, ročaji pa 95% interval zaupanja.	27
GRAF 3: Kvantilni diagram za število nosečnosti.	29
GRAF 4: Kvantilni diagram za število živorojenih otrok.	30

POVZETEK

Srce je mišičast organ, katerega naloga je dovajanje krvi, bogate s kisikom, po telesu. Razvijati se prične sredi 3. tedna razvoja zarodka. V Sloveniji se s prirojeno srčno napako (CHD) rodi med 80 do 100 otrok letno. Te predstavljajo manj kot 1 % vseh srčnih bolezni. Pomembno je, da bolezen čim prej odkrijemo in jo pričnemo zdraviti. Bolezen je lahko posledica genetskih sprememb, kromosomskih nepravilnosti in vplivov okolja. Znano je, da vnos folatov pred zanositvijo in v začetku nosečnosti zmanjša tveganje za prisotnost CHD. Folat ali vitamin B9 je esencialni vitamin. Dnevno ga moramo vnesti v telo 400 µg. Nosečnice morajo njegov dnevni vnos povečati na 600 µg. Z nezadostnim vnosom folatov in s prisotnostjo polimorfizmov v genih, ki sodelujejo pri presnovi folatov, se zviša tveganje za nekatere prirojene napake ploda. Med te štejemo tudi CHD. V magistrski nalogi smo analizirali vpliv pogostih polimorfizmov v genih za izbrane metiltransferaze BHMT, GNMT in DNMT3B na pojavnost CHD. Frekvence genotipov in alelov BHMT, GNMT in DNMT3B smo primerjali med otroki s CHD in zdravimi otroki ter med materami otrok s CHD in materami zdravih otrok. Vse genotipe smo analizirali v treh genetskih modelih, in sicer aditivnem, dominantnem in recesivnem. V statistično analizo smo poleg vpliva omenjenih polimorfizmov vključili tudi druge okoljske dejavnike, ki bi lahko vplivali na povišano tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak. Glavna ugotovitev študije je, da prisotnost mutiranega genotipa BHMT AA pri otroku trikrat poveča tveganje za nastanek CHD, medtem ko imajo matere z genotipom DNMT3B TT dvakrat manjše tveganje za rojstvo otroka s CHD. Ugotovili smo, da poleg genetskih dejavnikov na nastanek CHD značilno vplivajo tudi kadilski status matere, nižja izobrazba matere, pozitivna družinska anamneza, prisotnost kroničnih bolezni pri materi, pomanjkanje vnosa folatov ter vnos mineralov (Mg, Ca).

KLJUČNE BESEDE:

Prirojene srčne napake, genotipizacija, polimorfizmi, BHMT, GNMT, DNMT3B.

ABSTRACT

The heart is a muscular organ, which supplies the whole body with oxygen-rich blood. Its development begins in the middle of the third week of embryo-fetal development. Every year in Slovenia from 80 to 100 children are born with a congenital heart defect, representing less than 1 % of all heart diseases. It is important to promptly detect the disease and start the treatment. The disease may occur due to genetic changes, chromosomal aberrations and environmental factors. It is known that folate intake before conception and in early pregnancy reduces the risk of congenital heart diseases. Folate or vitamin B9 is an essential vitamin. The daily intake should be 400 µg, but pregnant women should increase their daily intake to 600 µg. An inadequate intake of folate and the presence of polymorphisms in genes involved in folate metabolism, increases the risk of certain congenital birth defects of the fetus. Among them are also congenital heart defects. In the master's thesis the influence of polymorphisms in genes for the selected methyltransferases BHMT, GNMT and DNMT3B was analyzed. The frequencies of genotypes and alleles of BHMT, GNMT and DNMT3B were compared between children with CHD and healthy children and between mothers of children with CHD and mothers of healthy children. All genotypes were analyzed in three models: additive, dominant and recessive model. Besides the influence of polymorphisms we were also analysing other environmental factors that could affect the risk of CHD. The main finding of the study was that the presence of a mutated genotype BHMT AA in the child three times increased the risk of CHD, while the mothers with the genotype DNMT3B TT had twice reduced the risk of having a child with CHD. We found out that in addition to genetic factors, the incidence of CHD is influenced by the mother's smoking status, lower maternal education, positive family history of congenital malformations, the presence of chronic disease in the mother, the lack of folate intake, and the introduction of minerals (Mg, Ca).

KEY WORDS:

Congenital heart defects, genotyping, polymorphisms, BHMT, GNMT, DNMT3B.

SEZNAM OKRAJŠAV

Arg	arginin
ASD	atrijski septum defekt
ATP	adenozin trifosfat
BHMT	betain-homocistein metiltransferaza
BMI	indeks telesne mase
CHD	prirojena srčna napaka (<i>ang. Congenital heart defects</i>)
dH₂O	destilirana voda
dNTP	deoksinukleozid-trifosfate
dTMP	deoksitimidin-monofosfat
dUMP	deoksiuridin-monofosfat
DHF	dihidrofolat
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DNMT	DNA metiltransferaza
DNMT1	DNA metiltransferaza 1
DNMT2	DNA metiltransferaza 2
DNMT3A	DNA metiltransferaza 3A
DNMT3B	DNA metiltransferaza 3B
FR-α	α receptor
Gln	glutamin
GNMT	glicin N-Metiltransferaza
H₀	ničelna hipoteza
H₁	alternativna hipoteza
Hcy	homocistein
KS	kontrolna skupina
LL	logaritem verjetje
Max	maksimum
MAT	metionin-adenoziltransferaza
Met	metionin
Min	minimum
MTHFD	metilentetrahidrofolat dehidrogenaza
MTHFR	metilentetrahidrofolat reduktaza

MTR	metionin sintaza
MTRR	metionin sintaza reduktaza
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OR	razmerje obetov
PBS	fosfatni pufer
PCFT1	visoko afinitetni protonsko vezani folatni receptor
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>ang. Polymerase Chain Reaction</i>)
RFC	reducirani folatni prenašalec
SAH	S-adenozilhomocistein
SAHH	S-adenozilhomocistein hidrolaza
SAM	S-adenozilmetionin
SD	standardna deviacija
SHMT	serin hidroksimetiltransferaza
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
TGA	transpozicija velikih žil
THF	tetrahidrofolat
TS	testna skupina
TYMS	timidilat sintaza
UNG	uracil-N-glikozilaza
VSD	ventrikularni septum defekt
5-MeTHF	5-metiltetrahidrofolat
5,10-metilenTHF	5,10-metilen tetrahidrofolat
10-formilTHF	10-formiltetrahidrofolat
CI	interval zaupanja

1. UVOD

1.1 SRCE

Srce je organ, katerega naloga je dovajanje krvi, bogate s kisikom, po telesu. Razvijati se prične sredi 3. tedna razvoja zarodka. Leži v prsnem košu med levim in desnim pljučnim krilom in je stožčaste oblike. Zgornji del srca ali baza je nekoliko širši in je obrnjen nekoliko bolj nazaj in desno. Spodnji del ali konica je koničaste oblike, obrnjena je navzdol in v levo. Njegova lega je pomaknjena nekoliko bolj v levo glede na središčnico. Pri odraslem tehta med 230 in 340 g in je veliko približno kot pest (1).

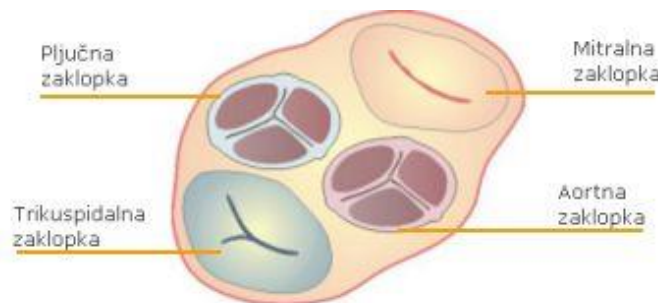
1.2 ZGRADBA SRCA

Srce obdajata notranja plast (serozni osrčnik) in zunanja plast (vezivni osrčnik). Serozni osrčnik je sestavljen iz dveh listov, in sicer obstranskega lista in drobovnega lista. Drobovni list je na površini srca in ga prekriva kot epikard, obstranski list pa odeva vezivni osrčnik z notranje strani. Med obema listoma je ozek prostor, ki ga imenujemo osrčnikova votlina. V njej je med 5 in 30 ml bistre serozne tekočine. Slednja je pomembna za vlaženje listov in posledično za zmanjšanje trenja ter deluje kot pregrada do drugih organov. Histološko je srčna stena sestavljena iz treh plasti – notranja plast (endokard), srednja plast (miokard) in zunanja plast (epikard) (1).

Srce delimo na levo in desno polovico. Ločuje ju mišična pregrada, imenovana srčni pretin. Obe polovici sta sestavljeni iz preddvora, ki leži zgoraj, in prekata, ki leži pod njim.

1.2.1 SRČNE ZAKLOPKE

Za ustrezno pretakanje krvi med preddvoroma in prekatoma skrbijo srčne zaklopke (Slika 1). Te so tudi na ustju velikih žil, ki vodijo v srce in iz njega. Naloga srčnih zaklopk je ta, da prepuščajo kri samo v eno smer. Zaklopke se pri vsakem



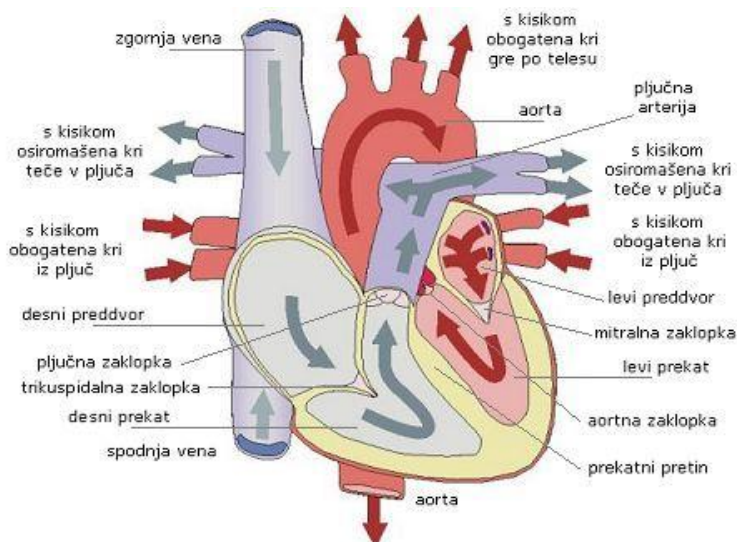
SLIKA 1: Srčne zaklopke (2).

utripu srca odpirajo in zapirajo. Ločimo med štirimi zaklopkami. Prvi par zaklopk se nahaja

med preddvoroma in prekatoma – mitralna zaklopka (leva atrioventrikularna zaklopka) in trikuspidalna zaklopka (desna atrioventrikularna zaklopka), drugi par pa se nahaja na ustju obeh arterij – aortna zaklopka in zaklopka pljučnega debla ali pljučna zaklopka. Mitralna zaklopka se nahaja v levi polovici srca med levim preddvorom in levim prekatom. Sestavljata jo dva vezivna lističa. Širši del lističa je priraščen na ogrodje srca, preostali del lističa pa je povezan z vezivnimi nitmi, ki so priraščene na stožčasto mišico. Vezivne niti preprečujejo uvihanje lističa ob sistoli prekata in posledičnemu vračanju krvi v preddvor. Trikuspidalna zaklopka leži med desnim preddvorom in prekatom. Sestavljena je iz treh vezivnih lističev, ki so ravno tako povezani z vezivnimi nitmi. Aortna zaklopka leži na meji med levim prekatom in aorto, pljučna pa med desnim prekatom in ustjem pljučnega debla. Tudi ti dve zaklopki sestavljajo trije vezivni lističi (1, 3).

1.3 KRVNI OBTOK

Krvni obtok (Slika 2) je razdeljen na veliki ali sistemski krvni obtok in mali ali pljučni krvni obtok. Veliki krvni obtok se prične v levem srčnem preddvoru, v katerega priteče kri, bogata s kisikom. Ta priteče iz pljuč po štirih pljučnih venah. Iz preddvora nadaljuje pot v levi prekat, od tu pa v aorto, ki vodi kri po celem telesu. Organi za svoje delovanje porabljajo kisik. S kisikom revna kri oziroma z ogljikovim dioksidom bogata kri se vrača v srce. Od tu naprej govorimo o malem krvnem obtoku. V desni preddvor se iz telesa vrača kri po dveh velikih venah. To sta zgornja in spodnja vena. Iz desnega preddvora nadaljuje pot v desni prekat in nato po pljučnem deblu v pljuča. V pljučih se kri ponovno obogati s kisikom in opisan postopek se ponovi (1, 3).



SLIKA 2: Krvni obtok (2).

1.4 PRIROJENE SRČNE NAPAKE

Prirojene srčne napake (CHD – *ang. Congenital heart defects*) so zelo redke, saj predstavljajo manj kot 1 % vseh srčnih bolezni. Njihova pogostnost je 5–8 na 1000 novorojenčkov. V Sloveniji se na leto rodi med 80 in 100 otrok s CHD (4). Pri osebah, ki imajo trisomijo 21 oziroma Downov sindrom, je prevalenca CHD zelo visoka, in sicer med 43–58 % (5). Pomembno je, da bolezen čim prej odkrijemo in pričnemo z zdravljenjem, saj je smrtnost zelo visoka. Večina otrok umre v prvem letu življenja. Danes je odkrivanje teh bolezni zelo uspešno, saj vsakega novorojenčka pregleda specialist za otroške bolezni. Pri odkrivanju teh bolezni imajo zelo pomembno vlogo sofisticirani ultrazvoki, s pomočjo katerih lahko diagnosticirajo vsakršno srčno napako. Vzrok za CHD je večinoma neznan. Bolezen je lahko posledica genetskih sprememb, kromosomskih nepravilnosti in vplivov okolja (4, 6, 7). Same molekulske osnove bolezni so v večini primerov še vedno neznane (5). Kljub številnim študijam je še veliko neodkritih dejavnikov, ki bi lahko povzročili prisotnost CHD. Predvsem je še premalo odkritega na področju okoljskih dejavnikov, ki bi lahko imeli negativen vpliv na razvoj (8).

Pomembno je, da se nosečnica izogiba zdravilom, ki bi lahko povzročile neustrezen razvoj ploda. Zlasti je znan talidomid, zaradi katerega ima lahko plod zelo hude posledice. Zelo škodljiva sta kajenje in alkohol, zato je pomembno, da se jima nosečnica izogiba. Za nekatere nalezljive bolezni in kronične bolezni je tudi znano, da povzročajo tveganje za CHD. Pomembno je, da se bodoča mamica posvetuje z ustreznim zdravnikom v primeru, da ima določeno bolezen in v primeru, ko načrtuje drugo nosečnost, če ima prvi otrok CHD. Tveganje, da se tudi naslednji otrok rodi s srčno napako, je v tem primeru 2–3 % (3, 4, 6). Nekatere srčne napake nimajo izrazitih kliničnih znakov, zato jih lahko odkrijemo pozneje. Zelo redko ostanejo te prikrite celo življenje. Pogostejša znamenja, ki lahko opozarjajo na srčno napako, so: oteženo dihanje med naporom, modrikavost ali cianoza (vidna je ob rojstvu ali pa veliko kasneje), betičasti prsti (ti večinoma spremljajo modrikavost), čepenje (otroci počivajo v čepečem položaju). Redkejša znamenja so nepojasneni glavoboli, vrtoglavice, mrzle noge, ponavljajoče se kratkotrajne nezavesti (3).

Otroke s prirojenimi srčnimi boleznimi uvrščamo v 4 podskupine:

1. otroci, pri katerih je potrebno opazovanje, a ne potrebujejo operacije;
2. otroci, ki čakajo na operacijo;

3. otroci, ki so že bili operirani;
4. otroci, ki so imeli paliativno operacijo in čakajo na nadaljnje operativno zdravljenje (7).

Med odrasle bolnike, ki imajo CHD, štejemo tiste, ki:

1. do odraslega obdobja niso potrebovali operacije;
2. so bili uspešno operirani;
3. so bili operirani le paliativno;
4. neoperabilne bolnike (6).

1.4.1 RAZLIKOVANJE PRIROJENIH SRČNIH NAPAK

CHD so anatomske, epidemiološke, klinične in razvojno zelo heterogene, zato jih je potrebno med seboj razlikovati (9). Pri razdelitvi CHD je potrebno poznati lego srca, poznati moramo posamezne segmente in njihovo povezanost. Razdelitve se lahko razlikujejo. Spodaj je opisana ena od mogočih razdelitev (6).

1. Acianotične CHD z levo-desnim šantom:

- defekt v preddvornem pretinu:
 - ostium secundum
 - ostium primum
 - sinus venosus
- defekt v prekatnem pretinu
- šant med aorto in desnimi srčnimi votlinami
- šant na ravni velikih arterij:
 - aortopulmonalno okno
 - odprt Botallov vod

2. Acianotične CHD brez šanta:

- anomalije leve strani srca:
 - prirojena obstrukcija vtoka v levi prekat
 - mitralna regurgitacija

- aortna stenoza
- aortna regurgitacija
- koarktacija aorte
- anomalije desne strani srca:
 - acianotična Ebsteinova anomalija
 - pulmonalna stenoza
 - prirojena pulmonalna regurgitacija
 - idiopatska dilatacija pulmonalne arterije

3. Cianotične CHD:

- cianotične srčne napake s povečanim pljučnim pretokom:
 - kompletna transpozicija velikih arterij
 - dvojni iztok iz desnega prekata brez pulmonalne stenoze
 - truncus arteriosus
 - totalni anomalni pulmonalni venski priliv
 - enojni prekat brez pulmonalne stenoze
 - enojni preddvor
 - sindrom hipoplastičnega levega srca
- Cianotične srčne napake z normalnim ali zmanjšanim pljučnim pretokom:
 - trikuspidalna atrezija
 - ebsteinova anomalija z desno-levim šantom
 - pulmonalna atrezija z defektom v prekatnem pretinu
 - tetralogija Fallot

4. Drugo:

- kongenitalno korigirana transpozicija velikih arterij (6).

V Sloveniji sta najpogostejši CHD ventrikularni septum defekt (VSD) in atrijski septum defekt (ASD). Zelo pogosto se pojavljajo tudi odprt Bottalov vod, pulmonalna in aortna stenoza ter transpozicija velikih žil (TGA) (4).

V primeru, da se odkrije srčno napako, je potrebno čimprejšnje zdravljenje. To je lahko različno. Pri nekaterih so pomembni redni pregledi pri kardiologu in spremljanje

napredovanja bolezni, nekatere oblike se zdravijo z zdravili, lahko pa je potrebna tudi operacija (4).

Znano je, da ustrezen vnos folatov pred zanositvijo in v začetku nosečnosti zmanjša možnosti za razvoj CHD (10).

1.5 FOLNA KISLINA

Folna kislina (Slika 3) ali vitamin B9 je esencialni in vodotopni vitamin. Dnevno ga moramo vnesti v telo 400 µg, nosečnice in doječe matere pa morajo dnevni vnos povečati na 600 µg.



SLIKA 3: Kemijska struktura folne kisline (11).

Priporočljivo je, da se vnos folatov poveča že pred zanositvijo, najkasneje 4 tedne prej. Molekula folata je sestavljena iz glutamata, p-aminobenzojske kisline in pteridinskega obroča. Sesalci ga sami ne moremo sintetizirati, zato ga moramo vnesti v telo s pomočjo hrane. Vir folatov so listnata zelenjava, grozdje, krompir, paradižnik, kumare, brstični ohrovt, špinaca, zelje, mleko, jajca, sir, meso, soja in polnozrnat žitni izdelki. S hrano živalskega izvora ga vnesemo v obliki tetrahidrofolata (THF). Nekaj se ga sintetizira tudi v debelem črevesu s pomočjo mikroorganizmov, saj so ti sposobni konjugirati pteridinski obroč z ostalimi podenotami. Uživanje folatov je zelo pomembno za naše telo. Pomembni so za normalno rast in delitev celic, sodelujejo v sintezi nukleinskih kislin, aminokislin in S-adenozilmetionina (SAM) (6, 12, 13).

1.5.1 ABSORPCIJA FOLATOV

V hrani so folati večinoma v obliki 5-metil-tetrahidrofolata (5-MeTHF) in 10-formil-tetrahidrofolata (10-formilTHF). Ti obliki sta polipeptidni, saj vsebujeta od ene do šestih molekul glutamata. Za absorpcijo je taka oblika neustrezna, zato pride do hidrolize do monoglutamatov, ki so ustrezni za absorpcijo. Za hidrolizo je potreben encim folilpoli-γ-glutamat karboksipeptidaza (14).

V krvi je folat največkrat v obliki 5-MeTHF-monoglutamata. 5-MeTHF vstopa v celice s pomočjo specifičnih folatnih receptorjev. V celice lahko vstopajo le monoglutamatne oblike, medtem ko poliglutamatne oblike ne morejo prestopiti membrane (15).

Monoglutamatne oblike se absorbirajo večinoma v dvanajstniku in težčem črevesu. Tu se nahajajo visoko afinitetni protonsko vezani folatni receptorji (PCFT1). Visoko afinitetni receptor za 5-MeTHF je α receptor (FR- α). Izraža se večinoma v proksimalnem tubulu, horoidnem plexusu in placenti. Druga skupina so receptorji z nizko afiniteto za 5-MeTHF. Med te prištevamo β in γ receptor. Do prenosa pride lahko tudi s pomočjo reduciranih folatnih prenašalcev (RFC) (14).

1.5.2 PRESNOVA FOLATOV

Opis presnove folatov (Slika 4) bomo pričeli pri spojini 5-MeTHF, za katero smo povedali, da je glavna oblika folata, ki kroži po krvi – nahaja se v krvni plazmi. V celico se prenese s pomočjo receptorjev in tam pride do cepitve metilne skupine, ki se prenese na homocistein (Hcy). Presnova folatov in Hcy sta tesno povezana. Encim, ki katalizira reakcijo prenosa metilne skupine na Hcy, je metionin sintaza (MTR). Pri tem nastane THF in metionin (Met). MTR za svoje delovanje potrebuje kofaktor kobalamin (vitamin B12) ter encim metionin sintazo reduktaze (MTRR). MTRR poskrbi, da je MTR v aktivni obliki, saj lahko oksidirana oblika kobalamina inaktivira MTR. Encim MTR je izražen vsepovsod (13, 14). Encim betain-homocistein metiltransferaza (BHMT) ima zelo podobno funkcijo kot MTR, vendar se ta za razliko od MTR večinoma izraža v jetrih in ledvicah. BHMT katalizira prenos metilne skupine iz betaina na Hcy, pri čemer nastane dimetilglicin in Met (13).

Met se v nadaljevanju pretvori v SAM v prisotnosti encima metionin-adenoziltransferaze (MAT) in adenozin trifosfata (ATP). Pri tem pride do cepitve metilne skupine, ki se prenese na različne biološke prejemnike, med katere uvrščamo tudi proteine in DNA. Če se metilna skupina prenese na DNA, reakcijo katalizirajo DNA metiltransferaze (DNMT). SAM se v nadaljevanju pretvori v S-adenozilhomocistein (SAH), ki je potencialni inhibitor številnih metiltransferaz. SAH se v prisotnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) pretvori v adenzin in Hcy. Hcy nadaljuje pretvorbo do cistationina in do končne oblike cisteina. Hcy in adenzin se morata neprestano transportirati iz celice ali metabolizirati, saj bi v nasprotnem primeru prišlo do kopičenja SAH (13).

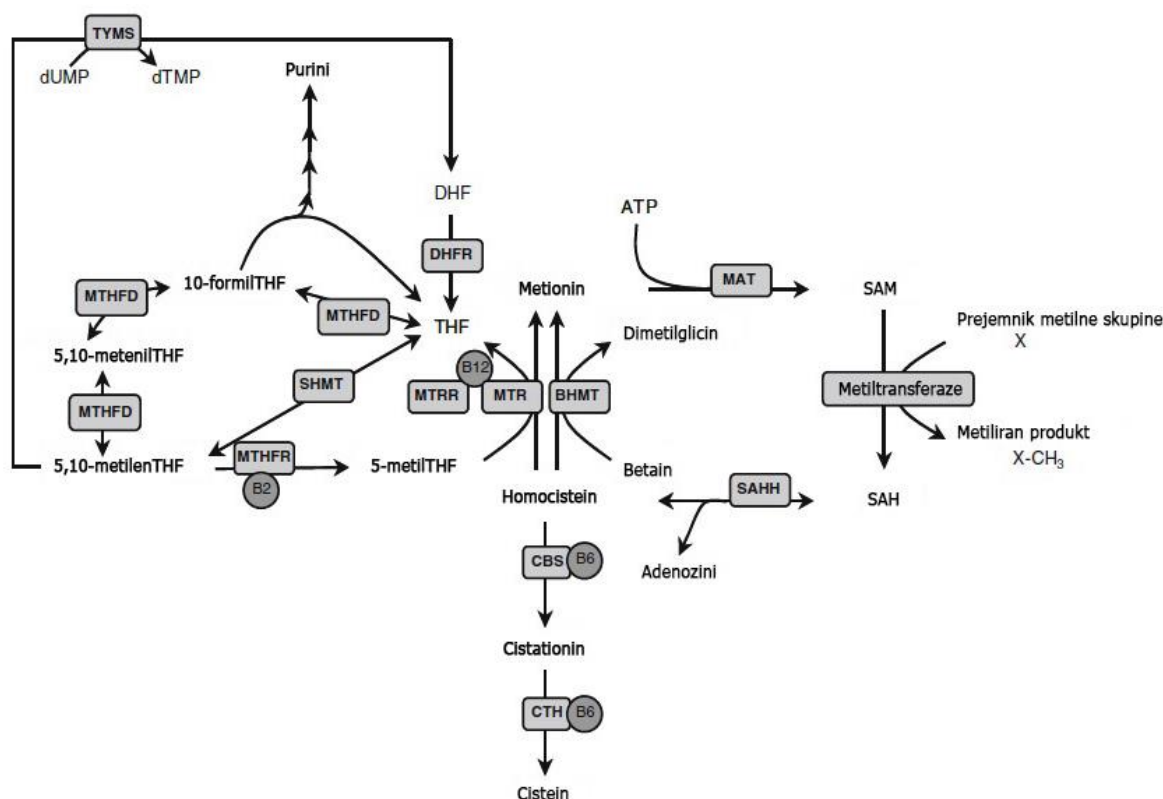
Folatna pot je zelo pomembna za nastanek predhodnikov nukleinskih kislin. THF, ki nastane iz 5-MeTHF, se v prisotnosti encima serin hidroksimetiltransferaze (SHMT) pretvori v 5,10-metilen tetrahidrofolat (5,10-metilenTHF). Ta se lahko uporabi za sintezo purinov, za sintezo 5-MeTHF ali pa sintezo timidilata (13).

Pretvorba 5-MeTHF v 5,10-metilenTHF je lahko tudi večstopenjska in poteka v prisotnosti encima metilentetrahidrofolat dehidrogenaze (MTHFD). Ta encim ima tri aktivnosti, kar je ključno za pretvorbo 5-MeTHF v 5,10-metilenTHF. Prva od aktivnosti je formiltetrahidrofolat sintazna aktivnost, ki poskrbi za pretvorbo 5-MeTHF v 10-formil tetrahidrofolat (10-formilTHF). 10-formilTHF se v nadaljevanju pretvori v 5,10-metenilTHF pri čemer je potrebna meteniltetrahidrofolat ciklohidrolazna aktivnost MTHFD. Končna pretvorba je pretvorba 5,10-metenilTHF v 5,10-metilenTHF, pri čemer je potrebna metilentetrahidrofolat dehidrogenazna aktivnost MTHFD (14).

Pri sintezi purinov je pomemben 10-formilTHF, ki odda ogljikovo skupino in se pri tem pretvori v THF. Encim timidilat sintaza (TYMS) pretvori 5,10-metilenTHF in deoksiuridin-monofosfat (dUMP) v deoksitimidin-monofosfat (dTMP) in dihidrofolat (DHF). DHF se pretvori v THF z encimom dihidrofolat reduktazo (DHFR) (13, 14).

5,10-metilenTHF se lahko pretvori tudi v 5-MeTHF. Ta pretvorba poteka v prisotnosti encima metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR), ki potrebuje za svoje delovanje vitamin B2 (riboflavin) (14).

Opisana presnova folatov je zelo natančno regulirana s koncentracijami metabolitov in kofaktorjev (13).



SLIKA 4: Presnova folatov (14).

TYMS – timidilat sintaza, MTHFD – metilentetrahidrofolat dehidrogenaza, SHMT – serin hidroksimetiltransferaza, MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza, DHFR – dihidrofolat reduktaza, MTRR – metionin sintaza reduktaza, MTR – metionin sintaza, BHMT – betain-homocistein metiltransferaza, CBS – cistationin β -sintaza, CTH – cistationin γ -liaza, MAT – metionin-adenoziltransferaza, SAHH – S-adenozilhomocistein hidrolaza, DHF – dihidrofolat, THF – tetrahidrofolat, ATP – adenzin trifosfat, SAM – S-adenozilmetionin, SAH – S-adenozilhomocistein, dUMP – deoksiuridin-monofosfat, dTMP – deoksitimidin-monofosfat

1.6 METILTRANSFERAZE

Metiltransferaze so podskupina encimov transferaz. So zelo velika skupina encimov, ki so v velikem obsegu še vedno neraziskani. Metilacija je proces, pri katerem pride do prenosa metilne skupine na akceptorsko molekulo. Donor metilne skupine je v večini primerov SAM. Metilacija spreminja funkcijo in strukturo biomolekul, med katere uvrščamo DNA, RNA, proteine in metabolite. Neustrezna metilacija lahko privede do različnih bolezni (16).

V magistrski nalogi smo izvedli analizo polimorfizmov v genih za encime betain-homocistein S-metiltransferaza (BHMT), glicin N-metiltransferaza (GNMT) in DNA metiltransferaza 3B (DNMT3B).

1.6.1 BETAIN-HOMOCISTEIN S-METILTRANSFERAZA

Betain-homocistein S-metiltransferaza ali BHMT (EC 2.1.1.5) je encim, ki katalizira pretvorbo betaina in Hcy v dimetilglicin in Met. V tej reakciji je donor metilne skupine betain. BHMT je od cinka odvisen encim, nahaja pa se večinoma v jetrih in ledvicah (13). Gen, ki kodira BHMT, je lociran na daljši ročici petega kromosoma (5q13.1-5q15). Protein, ki ga kodira, je sestavljen iz 406 aminokislin (17). Poznanih je več polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP). V magistrski nalogi smo analizirali polimorfizem rs3733890. Pri tem pride do substitucije gvanozina z adenzinom (c. 716G>A). Posledično pride tudi do zamenjave aminokislina, pri čemer se arginin (Arg) na mestu 239 zamenja z glutaminom (Gln) (18).

Encim BHMT ima pomembno vlogo pri uravnavanju metabolizma Hcy. Rezultat genetskih napak BHMT je homocist(e)inemija, lahko pa tudi homocistinurija. Dokazali so, da lahko povišana plazemska koncentracija Hcy vodi v razvoj aterosklerotičnih bolezni in tromboz (19, 20). Kot učinkovit postopek zdravljenja homocistinurij uporabljajo velike peroralne odmerke betaina. Betain poveča metilacijo Hcy z BHMT in koncentracija plazemskega Hcy značilno upade. To privede tudi do signifikantnega znižanja incidence tromboemboliz (20). Aktivnost encima je odvisna od vnosa hrane ter od hormonov. To so dokazali na podganah in piščancih. Izkazalo se je, da je aktivnost BHMT pri podganah odvisna od hrane in hormonskega zdravljenja, pri piščancih pa samo od hormonskega zdravljenja. Glede na te parametre so ugotovili, da je pristop k zdravljenju homocistinurij različen (20).

Jemanje pripravkov s folno kislino je priporočljivo že pred samo nosečnostjo. Znano je, da je v tem primeru zmanjšano tveganje za rojstvo otrok s prirojenimi težavami. Med te štejemo poškodbe nevralne cevi, srčne napake in prirojene razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline. Celična absorpcija, transport in presnova folatov delujejo kot zaščitni mehanizmi. Veliko teh mehanizmov je pa še neznanih in so predmet številnih študij. V študiji v Kaliforniji so postavili hipotezo, da plodova presnova in transport folatov lahko predstavljata tveganje za nekatere srčne bolezni in poškodbe nevralne cevi. Analizirali so 118 SNP v 14 genih, med drugim tudi BHMT (rs3733890). V analizo so vključili tudi diagnostične in

demografske podatke. Polimorfizem BHMT (rs3733890) je povečal tveganje za CHD 1,8-krat (95% interval zaupanja (95% CI) 1,1 – 3,1) (21). Boyles in kolegi so analizirali 28 SNP v 11 genih, ki so vpleteni v presnovo folatov in dokazali, da je le BHMT (rs3733890) povezan s povečanim tveganjem za spino bifido (22).

1.6.2 GLICIN N-METILTRANSFERAZA

Glicin N-metiltransferaza ali GNMT (EC 2.1.1.20) je encim, ki katalizira prenos metilne skupine iz SAM, ki odda metilno skupino na glicin, ki je prejemnik metilne skupine.

Pri tem nastane SAH in sarkozin (23). Tudi tu je poznanih več SNP. V magistrski nalogi smo analizirali rs10948059. Pri tem pride do substitucije nukleotida, kjer se citozin zamenja s timinom (c. - 45C>T). Gre za mutacijo v regulatorni regiji gena, ki vpliva na njegovo izražanje.

SAM je vključen v številne reakcije, v katerih se sintetizirajo male molekule, kot sta RNA, DNA, ter sodeluje pri metilaciji proteinov. Sarkozin je intermediat, ki hitro razpade. V glicin se pretvori s pomočjo encima sarkozin dehidrogenaze. GNMT je tesno povezan s presnovo folata. Pomembna lastnost folatnega cikla je ta, da priskrbi metilne skupine, ki se prenesejo na SAM preko biosinteze Met. Celoten potek reakcij je odvisen od razmerja SAM/SAH ter od metilacijskega potenciala v celici (24).

GNMT je torej pomemben regulacijski encim pri presnovi folata, sodeluje pri transmetilacijskih reakcijah in skrbi za razpoložljivost in ravnovesje metilnih skupin. Poleg vsega naštetega vpliva tudi na presnovo Hcy (23, 25).

Ko je koncentracija SAH povišana, pride do znižanja aktivnosti encima MTHFR in znižano je tudi nastajanje 5-metil-THF. Zviša se aktivnost encima GNMT in posledično pride do vpada koncentracije SAH. Ravno obratno se zgodi v primeru, ko je koncentracija SAH znižana. V tem primeru je povišana tvorba 5-metil-THF, znižana je aktivnost encima GNMT in koncentracija SAH se poviša (23).

GNMT je glavni jetrni folat vezoči protein (26). V jetrni celici zastopa 1-3 % vseh citosolnih proteinov. Najmočneje se izraža v jetrih, ledvicah in trebušni slinavki. Manj se izraža na prostati, v srcu, možganih, pljučih, ovarijih in testisih. Je tetramerni protein, sestavljen iz štirih identičnih podenot, ki so velike 32kDa. Je polipeptidni protein, saj posamezno podenoto sestavlja 292 aminokislin. Le tetramerna oblika proteina je katalitično aktivna. Poznani sta še monomerna in dimerna oblika, ki pa sta katalitično neaktivni. Na vsaki

podenoti se nahaja po en katalitični center. Na eno tetramerno molekulo GNMT se lahko vežeta dve molekuli 5-metil-THF (24).

V eni izmed študij so ugotovili, da je GNMT izredno pomemben pri delitvi in razvoju hepatocitov. Študijo so izvedli na miškah, ki so jim izbili gen GNMT. V študiji so raziskovali tudi povezavo med GNMT in rakavim obolenjem. Ugotovili so, da količina GNMT močno upade v tumorskem tkivu, pri regeneraciji tega tkiva pa pride ponovno do normalnih koncentracij GNMT, kar kaže na to, da GNMT deluje kot tumor supresorski gen. V isti študiji so določili tudi lokalizacijo GNMT in ugotovili, da se ta nahaja v jedru (24).

1.6.3 DNA METILTRANSFERAZA 3B

DNA metiltransferaza 3B ali DNMT3B (EC 2.1.1.37.) je encim, ki katalizira prenos metilne skupine iz SAM na DNA. To se zgodi med »*de novo*« metilacijo in pri tem pride do nastanka metilacijskega vzorca genoma pri razvoju. Pri tem procesu se tvori kovalentna vez med citozinskim ostankom in metilno skupino. Posledica tega procesa je nastanek »CpG otočkov«. To so regije DNA, bogate s CpG, in merijo približno 1Kb v dolžino. Večinoma se nahajajo v promotorskih regijah genov. Opisan epigenetski proces ima pomembno vlogo pri izražanju genov. V večini primerov hipermetilacija povzroči utišanje (neizražanje) gena, pri hipometilaciji pa se gen izraža (27). Pomembna je ravno pravišnja metilacija, saj lahko prekomerna hipermetilacija ali hipometilacija privede do nastanka nekaterih bolezni, kot so rak, sladkorna bolezen in psihične motnje. Za DNA metilacijo skrbijo predvsem DNA metiltransferaza 1 (DNMT1), DNA metiltransferaza 2 (DNMT2), DNA metiltransferaza 3A (DNMT3A) in DNMT3B (5,28).

V magistrski nalogi smo analizirali polimorfizem rs2424913. Pri tem pride do substitucije nukleotida, kjer se citozin zamenja s timinom (c.307 - 49 C>T). Gre za intronsko mutacijo z neznanim mehanizmom delovanja.

V študijah, ki sta jih izvedla James (1999) in Hobbs (2000), so postavili hipotezo, da polimorfizmi v genih za presnovo folatov vplivajo na neustrezno delitev celic med mejozo ter vplivajo na neustrezno metilacijo 21. kromosoma. Z mutacijo DNMT3B in neustrezno DNA metilacijo so povezali primere monogenskih bolezni, pomanjkljivo imunost, nestabilnost centromernih regij in prisotnost obraznih anomalij (13).

Tetralogija Fallot predstavlja približno 10 % od vseh CHD. V spodaj opisani študiji so ugotavljali, kako lahko metilacija vpliva na pojav te bolezni. Analizirali so vzorce testne

skupine (TS) in kontrolne skupine (KS). V TS so bili vključeni pacienti, ki so imeli omenjeno bolezen, v KS pa so analizirali vzorce srca, ki so jih dobili po smrti zdravih darovalcev. Izolirali so DNA in RNA in analizirali metilacijski vzorec. Po analizi so iz rezultatov ugotovili, da so imeli pacienti s Tetralogijo Fallot statistično značilno nižjo raven mRNA. Po analizi metilacijskega vzorca DNA so ugotovili znižano metilacijo v TS (28).

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je ugotoviti, ali pogosti polimorfizmi v genih za encime BHMT, GNMT in DNMT3B povečajo tveganje za nastanek CHD.

V ta namen bomo iz brisov bukalne sluznice otrok s CHD in njihovih mater ter zdravih otrok in njihovih mater izolirali DNA in izvedli genotipizacijo polimorfizmov BHMT rs3733890, GNMT rs10948059 in DNMT3B rs2424913 z uporabo TaqMan tehnologije.

Frekvence genotipov in alelov BHMT, GNMT in DNMT3B bomo primerjali med otroki s CHD in zdravimi otroki ter med materami otrok s CHD in materami zdravih otrok. Pri analizi bomo upoštevali tudi dejavnike okolja. Predvidevamo, da imajo tako otroci s CHD kot njihove matere višjo frekvenco mutiranih alelov treh izbranih metiltransferaz kot zdravi otroci in njihove matere.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V študijo sta bili vključeni dve skupini preiskovank in njihovih otrok: kontrolna (KS) in testna (TS) skupina. Vključevanje in zbiranje brisov bukalne sluznice KS (mater in njihovih zdravih otrok) je potekalo v Porodnišnici Ljubljana v obdobju od septembra 2014 do novembra 2014. Vključenih je bilo 199 parov mater in otrok. Vključevanje in zbiranje brisov bukalne sluznice TS (mater in njihovih otrok s CHD) je potekalo v Službi za kardiologijo Pediatrične klinike UKC Lj v obdobju od marca 2014 do septembra 2015. V to skupino je bilo vključenih 150 parov mater in otrok.

3.2 POSTOPKI RAZISKAVE

Naše delo je zajemalo izolacijo DNA iz brisov bukalne sluznice z metodo izsoljevanja DNA. Temu je sledila meritev koncentracije izolirane DNA in redčenje vzorcev do zelene koncentracije. Nadaljevali smo z genotipizacijo vzorcev. Uporabili smo verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v realnem času, za detekcijo polimorfizmov pa smo uporabili specifični način detekcije s hidrolizirajočimi sondami TaqMan. Rezultate smo tudi statistično obdelali.

Poleg določitve prisotnosti polimorfizmov ter ugotavljanja, ali imajo ti vpliv na prisotnost srčnih napak, smo analizirali tudi okoljske dejavnike, ki bi lahko imeli potencialen vpliv na nastanek CHD. Preiskovankam so pred odvzemom brisa bukalne sluznice razdelili anketne vprašalnike. Primera anketnih vprašalnikov se nahajata v prilogi (Priloga 1 in 2). Anketni vprašalnik v uvodnem delu sestavljajo splošna vprašanja, ki so jih izpolnile vse preiskovanke. Tu so osebni podatki o preiskovanki, demografski podatki, podatki o tem, ali ima preiskovanka že otroka, status izobrazbe ter kadilski status. Nato se vprašalnik razdeli na dva dela. Prvi del je namenjen materam, ki imajo zdrave otroke, drugi del pa izpolnijo matere otrok, ki imajo srčno okvaro. Tu so številna vprašanja, ki se nanašajo na okoljske dejavnike tveganja za nastanek prirojenih napak. Na koncu se vprašalnik zaključuje z vprašanji o prehrani v zadnjih štirih tednih. Ta vprašanja so namenjena vsem preiskovankam.

Naloga je del projekta Analiza bioloških označevalcev presnove folatov pri ugotavljanju tveganja za nastanek napak nevralne cevi in prirojenih okvar srca (šifra projekta: J3-5507).

Študija je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 57/01/13). Vse matere, ki so bile vključene v študijo, in vsi otroci, starejši od 18 let, so morali podpisati Obveščeni pristanek.

3.3 REAGENTI IN OPREMA

3.3.1 REAGENTI ZA IZOLACIJO DNA

- MASTERPURE™ DNA purification kit (Epicentre® an Illumnia company):
 - Red Cell Lysis Solution
 - Tissue and Cell Lysis Solution
 - Proteinase K
 - MPC Protein Precipitation Reagent
 - TE Buffer
- 70 % etanol
- 100 % izopropanol
- fosfatni pufer (PBS)

3.3.2 APARATURE IN MATERIALI ZA IZOLACIJO DNA

- mešalnik Vortex
- centrifuga Eppendorf 5415R
- vodna kopel Biosan WB-4MS
- pipete Eppendorf Research (2,5 µL, 100 µL in 1000 µL)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- avtoklavirane 2 mL Eppendorfove epruvete

3.3.3 APARATURE IN REAGENTI ZA MERITEV KONCENTRACIJE DNA IN REDČENJE VZORCEV

- pipete Eppendorf Research (2,5 µL in 100 µL)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- avtoklavirana destilirana voda (dH₂O)

- avtoklavirane Eppendorfove epruvete
- kapljični spektrofotometer NanoDrop ND-1000

3.3.4 REAGENTI ZA GENOTIPIZACIJO

- TaqMan® Universal Master Mix II z UNG, 2x (Applied Biosystems) – mešanica, ki je zmes uracil-N-glikozilaze UNG, dNTP, dUTP, ROX™ pasivne reference, pufra in AmpliTaq Gold® DNA polimeraze.
- TaqMan® Assay, 20x (Applied Biosystems) – vsebuje sonde in oligonukleotide:
 - rs3733890 za BHMT (C_11646606_20)
 - rs10948059 za GNMT (C_11425842_10)
 - rs2424913 za DNMT3B (C_25620192_20)
- avtoklavirana dH₂O

3.3.5 APARATURE IN MATERIALI ZA GENOTIPIZACIJO

- 0,5 mL avtoklavirane epruvete Eppendorf
- pipete Eppendorf Research (2,5 µL, 20 µL in 200 µL)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- mikrotitrna ploščica s 384 luknjicami
- zaščitna folija za mikrotitrsko ploščico
- vorteks Biosan
- centrifuga Centric 322A
- komora Biosan
- Roche Lightcycler 480

3.3.6 DRUGI APARATI

- hladilnik
- avtoklav A-21, laboratorijska oprema Kambič
- sušilnik Heraeus Instruments

3.4 IZOLACIJA DNA

DNA smo izolirali iz brisa bukalne sluznice preiskovancev. Poznamo več metod izolacije DNA. V magistrski nalogi smo uporabili metodo z izsoljevanjem DNA.

Postopek izolacije DNA:

- V sterilno Eppendorfovo epruveto smo odpipetirali 500 μL PBS (uporabili smo PBS namesto Red cell Lysis Solution).
- V Eppendorfovo epruveto smo nato dali bris bukalne sluznice in počakali nekaj minut, da so se iz vatirane palčke odstranile celice.
- Centrifugirali smo 2 minuti ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\sim 10000 \times g$), da so se celice posedle na dno epruvete.
- Odstranili smo supernatant in pustili $\sim 20\text{--}25\text{ }\mu\text{L}$ vsebine v Eppendorfovi epruveti v kateri so se nahajale celice.
- Sledilo je vorteksiranje s katerim smo celice resuspendirali.
- Pripravili smo mešanico Proteinase K in Tissue and Cell Lysis Solution in sicer smo za posamezni vzorec zmešali 1 μL Proteinase K v 300 μL Tissue and Cell Lysis Solution. Potrebno je bilo narediti toliko mešanice, kolikor vzorcev smo izolirali.
- Mešanico Proteinase K in Tissue and Cell Lysis Solution smo dodali suspendiranemu vzorčku in vorteksirali.
- Inkubirali smo na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 15 minut. Vsakih 5 minut smo vzorec vorteksirali.
- Vzorce smo dali na led za $\sim 3\text{--}5$ minut.
- Vzorčkom smo dodali 150 μL MPC Protein Precipitation Reagent in vorteksirali ~ 10 sekund.
- Centrifugirali smo 10 minut ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\geq 10000 \times g$).
- Supernatant v katerem je bila DNA smo prenesli v čisto Eppendorfovo epruveto, oborjene proteine pa smo zavrgli.
- Supernatantu smo dodali 500 μL izopropanola in 30–40-krat obrnili Eppendorfovo epruveto.
- Centrifugirali smo 10 minut ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\geq 10000 \times g$).
- Previdno smo odstranili izopropanol in pazili, da pri tem nismo poškodovali peletke.
- 2-krat smo spirali s 70 % etanolom:

- Dodali smo 500 μL 70 % etanola in centrifugirali 5 minut ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\geq 10000 \times g$)
- Previdno smo odstranili etanol in pazili, da nismo poškodovali peletke.
- Eppendorfove epruvete smo pustili ~ 1 uro odprte, da je preostali etanol izhlapel.
- DNA smo resuspendirali v 35 μL TE pufra.

3.5 MERJENJE KONCENTRACIJE DNA

Po končani izolaciji je sledila meritev koncentracije DNA. Koncentracijo izolirane DNA smo določili z meritvijo absorbance pri valovni dolžini 260 nm s pomočjo spektrofotometra Nanodrop 1000. Velja, da je absorpcija svetlobe linearno odvisna od koncentracije nukleinskih kislin. Linearnost velja za vrednosti absorbanc pod 1. Nad 1 zveza ni več linearna.

Pred meritvijo koncentracije smo vzorčke dobro premešali, da smo jih čim bolj homogenizirali. Preden smo se lotili meritev, smo spektrofotometer najprej dobro očistili z dH_2O . Nato smo zagnali računalniški program NanoDrop. Najprej smo opravili meritev slepega vzorca, za kar smo uporabili TE pufer. Za tem je sledila meritev koncentracij vzorcev.

3.6 GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR (*ang. Polymerase Chain Reaction*) je metoda *in vitro*, s katero lahko v zelo kratkem času sintetiziramo veliko kopij želenega odseka. Metoda je bila opisana in patentirana leta 1985. Velika prednost te metode je ta, da za analizo potrebujemo zelo majhno količino vzorca. V reakcijski zmesi za PCR potrebujemo DNA (matrica), oligonukleotidna začetnika, deoksinukleozid-trifosfate (dNTP-je), Mg^{2+} , reakcijski pufer ter termostabilno DNA-polimerazo. Oligonukleotidna začetnika služita za omejitev odseka DNA, ki ga želimo pomnožiti, dNTP-ji pa nam služijo kot gradniki novonastalih DNA. Mg^{2+} je potreben v reakciji, saj je kofaktor termostabilnih DNA-polimeraz in je pomemben za stabilizacijo interakcije med encimom in matrico. Za uravnavanje ustreznega pH skrbi reakcijski pufer. Ustrezen pH je pomemben za ustrezno delovanje DNA-polimeraze (29).

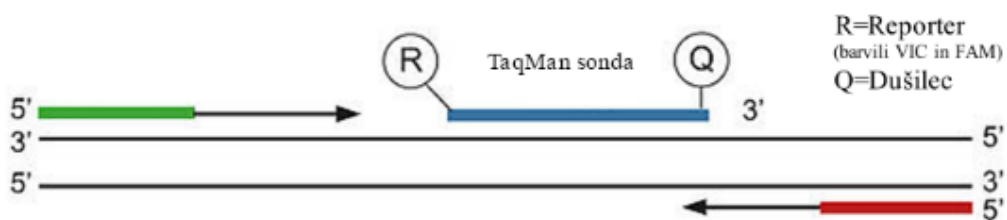
Reakcija PCR poteka v treh stopnjah. Prva stopnja je denaturacija, pri kateri pride do ločitve verig DNA, in tako dobimo enoverižni verigi. Da dosežemo to stopnjo, moramo reakcijsko zmes segreti 94–95 °C. V drugi stopnji pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na razklenjeni verigi DNA. To stopnjo dosežemo tako, da znižamo temperaturo na 40–60 °C. Temu sledi ponoven dvig temperature na 72 °C, pri kateri poteka še tretja stopnja, pri kateri pride do izgrajevanja komplementarnih verig DNA. Ta temperatura je optimalna za delovanje encima termostabilne DNA-polimeraze, ki se veže na oligonukleotidna začetnika. Komplementarna veriga se sintetizira v smeri od 5' proti 3' koncu. DNA, ki nastaneta v tem ciklu, služita kot matrici v drugem ciklu. Cikle ponavljamo po opisanem postopku. Običajno se izvede od 20 do 40 ciklov. Pred prvim ciklom je potrebna še začetna denaturacija, po zadnjem ciklu pa zaključno podaljševanje (29).

Danes se poleg osnovnega PCR izvajajo še številne druge različice PCR, ki temeljijo na enakem zgoraj opisanem osnovnem principu. Namen le-teh je povišanje specifičnosti reakcije, pomnožitev daljšega odseka DNA, sočasna pomnožitev več odsekov in pomnožitev DNA. Metoda PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo klasične metode, ker omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med potekom reakcije. Novonastale produkte lahko spremljamo s pomočjo merjenja fluorescence. Sestavljajo jo tri faze: eksponentna, linearna in plato. V prvi fazi količina produkta narašča eksponentno. V poznejših ciklih pomnoževanje ni več eksponentno, ker začne upadati koncentracija sestavin v reakcijski zmesi. Linearna faza je tista, v kateri je pomnoževanje počasnejše. Ko je pomnoževanje zaključeno, je dosežena faza platoja (29).

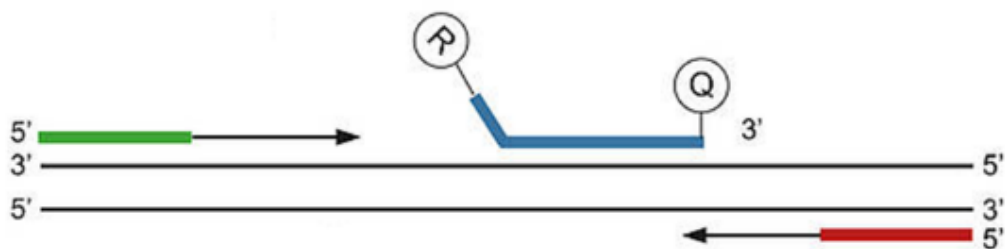
V našem primeru pri pomnoževanju ni šlo za tipično metodo PCR v realnem času, saj smo signal detektirali le v končni točki.

Poznana sta specifični in nespecifični način detekcije za PCR v realnem času. V magistrski nalogi smo uporabili specifični način detekcije s hidrolizirajočimi sondami TaqMan® (Slika 5). Za sonde je značilno, da se v stopnji prileganja specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Sonda ima 5' in 3' konca, na katerih sta vezani barvili. Na 5' koncu je reportersko barvilo, ki emitira svetlobo, na 3' koncu pa je dušilec, ki prestreže svetlobo reporterskega barvila. V fazi podaljševanja povzroči Taq DNA-polimeraza hidrolizo sonde. Ker se razdalja med reporterjem in dušilec poveča, dušilec ne more več prestrezati svetlobe. Takrat detektiramo fluorescenco reporterskega barvila. Fluorescenca reporterskega barvila je sorazmerna s količino produkta (29).

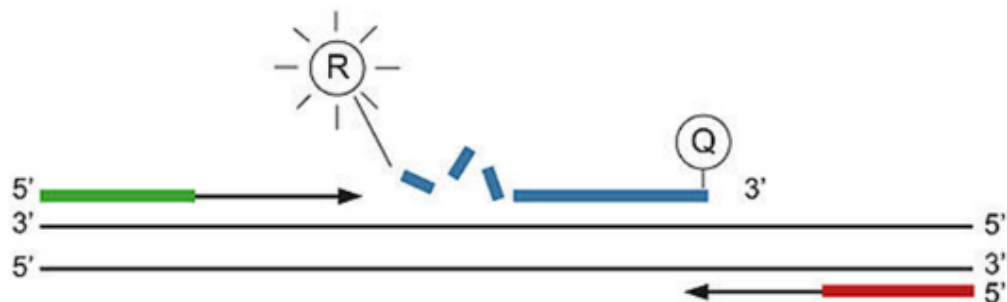
1. Specifično prileganje oligonukleotidnih začetnikov in TaqMan sonde



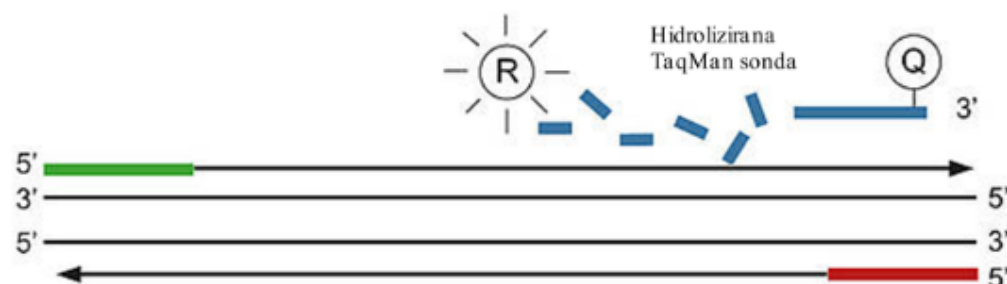
2. Podaljševanje DNA verige



3. Hidroliza TaqMan sonde



4. Porast fluorescence reporterskega barvila



SLIKA 5: Prikaz genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami (30).

V posamezni mešanici reagentov (TaqMan[®] Assay) se nahajata dve sondi, označeni z različnima reporterskima barviloma VIC in FAM, pri čemer se ena specifično prilega mutiranemu alelu, druga pa alelu divjega tipa. V preglednici (Preglednica 1) so prikazani podatki o uporabljenih reagentih TagMan[®], ki smo jih uporabili za genotipizacijo.

PREGLEDNICA 1: Podatki o uporabljenih reagentih TaqMan®.

Številka reagenta	Preiskovan gen	NCBI SNP	Polimorfizem	Sonda označena z barvilom VIC	Sonda označena z barvilom FAM
C_11646606_20	BHMT	rs3733890	716 G > A	A - mutiran	G - divji tip
C_11425842_10	GNMT	rs10948059	(-)45 C > T	C - divji tip	T - mutiran
C_25620192_20	DNMT3B	rs2424913	(-)149C > T	C - divji tip	T - mutiran

NCBI – National Center for Biotechnology Information

Postopek genotipizacije:

Po končanem redčenju vzorcev je sledila njihova genotipizacija. Najprej je bilo potrebno žarčenje delovne komore in pripomočkov z UV svetlobo. Material, ki smo ga žarčili: pipete, avtoklavirani nastavki za pipete, 0,5 mL avtoklavirane epruvete, flomaster in mikrotitrna ploščica. Komoro z materialom smo žarčili približno 15 minut. Vzorce smo dobro premešali (vorteksirali) ter si pripravili reakcijsko mešanico za PCR, ki vsebuje TaqMan® Universal Master Mix, TaqMan® Assay in avtoklavirano dH₂O. Za posamezno reakcijo smo uporabili:

- 2,5 µL TaqMan® Universal Master Mix II z UNG
- 0,125 µL TaqMan® Assay
- 0,875 µL dH₂O

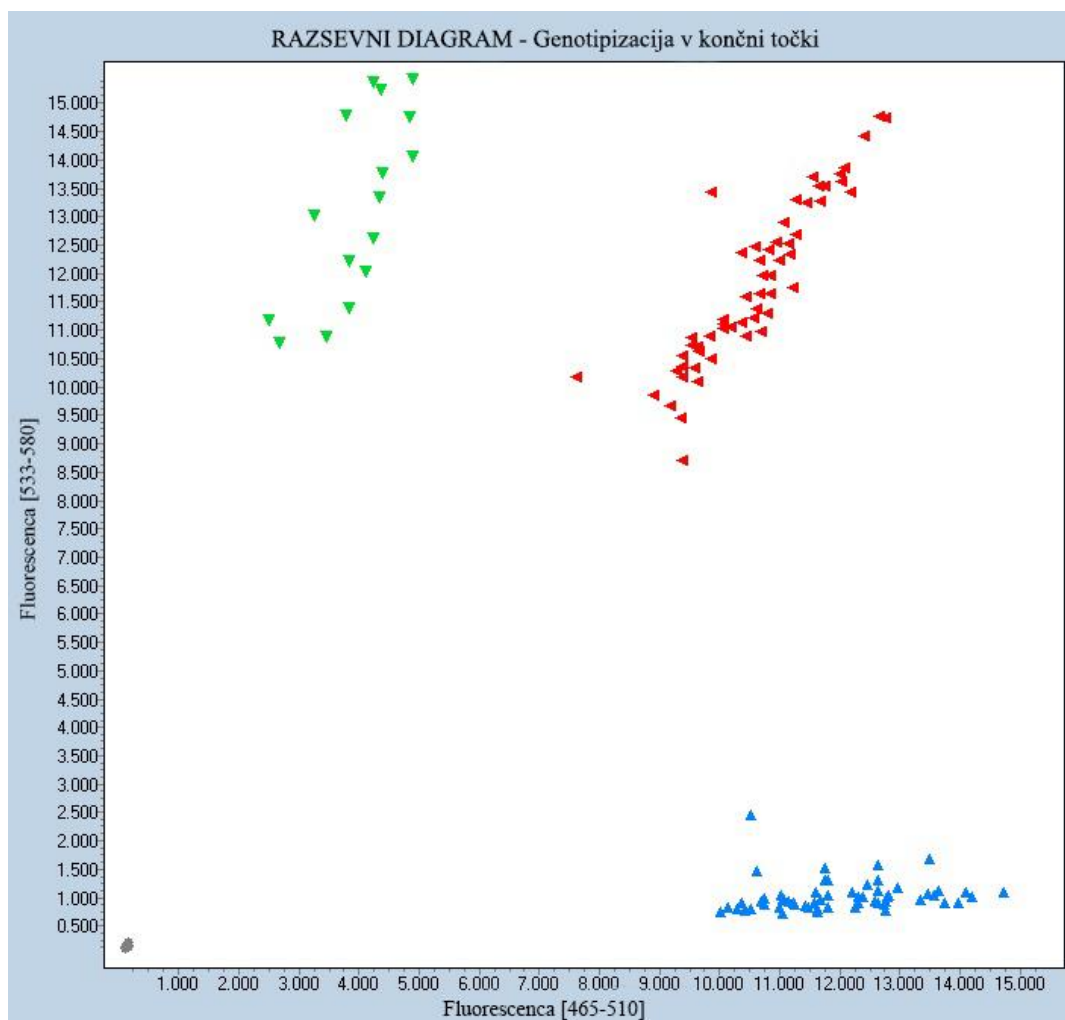
Pripravili smo toliko reakcijske mešanice, kot je bilo vzorčkov, ter nekaj pribitka. Ko smo mešanico pripravili, smo jo dobro premešali. Sledilo je pipetiranje vzorcev in reakcijske mešanice v mikrotitrsko ploščico s 386 vdolbinicami. V posamezno vdolbinico smo pipetirali:

- 3,5 µL reakcijske mešanice
- 1,5 µL vzorca s koncentracijo DNA 4 ng/µL

V zadnjo vdolbinico smo napipetirali slepi vzorec (namesto vzorca z DNA smo dali 1,5 µL avtoklavirane dH₂O). S tem smo preverili, ali ni prišlo do kontaminacije reagentov. Ko smo končali s pipetiranjem, smo ploščico pokrili z zaščitno folijo. Sledilo je centrifugiranje, ki je trajalo 5 minut. Nato smo ploščico vstavili v aparaturo za RT-PCR Lightcycler 480 ter nastavili program izvedbe PCR s TaqMan® sondami za posamezne stopnje. Pred samo PCR reakcijo je najprej potekla UNG inkubacija pri 50 °C za 2 minuti ter aktivacija Taq DNA polimeraze pri 95 °C za 10 minut. Sledilo je 50 ciklov PCR reakcij:

- Denaturacija DNA: 95 °C, 15 sek
- Prileganje oligonukleotidnih začetnikov / podaljševanje: 60 °C, 1 min

Po končani genotipizaciji je sledila analiza podatkov in grafa genotipizacije. V spodnjem razsevnem diagramu je prikazan primer rezultatov genotipizacije za polimorfizem BHMT rs3733890 (Graf 1). Vsaka točka na grafu predstavlja analiziran vzorec. X-os grafa predstavlja fluorescenco barvila FAM, Y-os pa fluorescenco barvila VIC. Sonda VIC se je vezala na mutirano zaporedje AA, sonda FAM pa na nemutirano zaporedje GG. Točke so porazdeljene v tri skupine, kar predstavlja tri različne genotipe. Zelene točke prikazujejo homozigote za mutirano zaporedje AA, modre točke homozigote za nemutirano zaporedje GG, rdeče točke pa heterozigote AG. Sive točke v izhodišču diagrama predstavljajo slepi vzorec.



GRAF 1: Razsewni diagram - genotipizacija v končni točki za polimorfizem BHMT rs3733890.

3.7 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Na koncu je sledila še statistična analiza dobljenih podatkov. Analizirati je bilo potrebno anketne vprašalnike, ki so jih izpolnile vse preiskovanke, vključene v študijo, ter rezultate genotipizacije. Podatke smo analizirali s pomočjo računalniškega programa SPSS.

Najprej smo se lotili analize normalnosti porazdelitve testiranih spremenljivk, pri kateri smo analizirali telesno višino matere, število nosečnosti, število živorojenih otrok, število splavov, starost matere ob zanositvi, materino težo ob zanositvi, mesečni vnos Met, mesečni vnos folne kisline ter indeks telesne teže (BMI). Pri tem smo uporabili Shapiro-Wilkov test, kateri nam potrdi ali zavrže predpostavko o normalni porazdelitvi vrednosti. Razlike med TS in KS smo analizirali s t-testom za normalno porazdeljene spremenljivke in z Mann-Whitneyevim U-testom za spremenljivke, ki se ne porazdeljujejo normalno. Kategorične spremenljivke smo analizirali s Fisherjevim natančnim testom, pri čemer smo v analizo vključili TS in KS ter ju obravnavali kot dva neodvisna vzorca. Analizo smo izvedli s pomočjo kontingenčne tabele. Analizirane kategorične spremenljivke so bile kajenje, izobrazba, družinska anamneza, spol otroka, gestacijski diabetes, druge kronične bolezni, protiepileptična zdravila, druga zdravila, zvišana telesna temperatura, uporaba savne, vnos folatov in vnos drugih prehranskih dodatkov. Za konec smo izvedli še logistično regresijo, s katero smo iskali povezavo med odvisno spremenljivko in več neodvisnimi spremenljivkami. Analizirali smo skupni vpliv genotipov in drugih okoljskih dejavnikov na pojavnost CHD.

Vsi testi so bili dvostranski. Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevali $\alpha = 0,05$.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, ali lahko prisotnost polimorfizmov v genih za encime BHMT, GNMT in DNMT3B vpliva na nastanek CHD. Poleg tega nas je zanimalo, ali na CHD vplivajo tudi drugi dejavniki. Informacijo o teh smo dobili s pomočjo vprašalnika, ki so ga izpolnile vse udeleženske v študiji. Dobljene rezultate genotipizacije in rezultate anketnih vprašalnikov smo statistično obdelali.

4.1 PORAZDELITEV PODATKOV

Najprej smo se lotili analize normalnosti porazdelitve testiranih spremenljivk. V analizo smo vključili naslednje podatke o preiskovankah: telesno višino preiskovanke, število nosečnosti, število živorojenih otrok, število splavov, starost matere ob zanositvi, materino težo ob zanositvi, mesečni vnos Met v gramih, mesečni vnos folne kisline v mikrogramih ter BMI.

PREGLEDNICA 2: Normalnost porazdelitve testiranih spremenljivk (Shapiro-Wilkov test).

SPREMENLJIVKA	SKUPINA	Shapiro-Wilkov test
		p
Višina matere	KS	0,463
	TS	0,043
Število nosečnosti	KS	< 0,001
	TS	< 0,001
Število živorojenih otrok	KS	< 0,001
	TS	< 0,001
Število splavov	KS	< 0,001
	TS	< 0,001
Starost matere ob zanositvi	KS	0,331
	TS	0,141
Telesna teža matere ob zanositvi	KS	< 0,001
	TS	< 0,001
Vnos metionina na mesec (g)	KS	< 0,001
	TS	< 0,001
Vnos folne kisline na mesec (μg)	KS	< 0,001
	TS	< 0,001
Indeks telesne mase	KS	< 0,001
	TS	< 0,001

Iz preglednice (Preglednica 2) je razvidno, da se je le malo podatkov porazdeljevalo normalno ($p > \alpha$; $\alpha = 0,05$) – modro obarvane celice v preglednici. Ti so višina matere v KS ter starost matere ob zanositvi v KS in TS.

Preverjanje normalnosti porazdelitve smo izvedli zato, ker je le-ta pomembna pri izbiri nadaljnjih statističnih testov (31).

4.2 UNIVARIANTNA STATISTIČNA ANALIZA

Parametrične teste uporabimo, ko preverjamo predvsem povprečje in varianco populacij ter predpostavljamo, da je vzorec vzet iz populacije, ki je približno normalno porazdeljena (31). V našem primeru je temu pogoju zadostila le spremenljivka starost matere ob zanositvi.

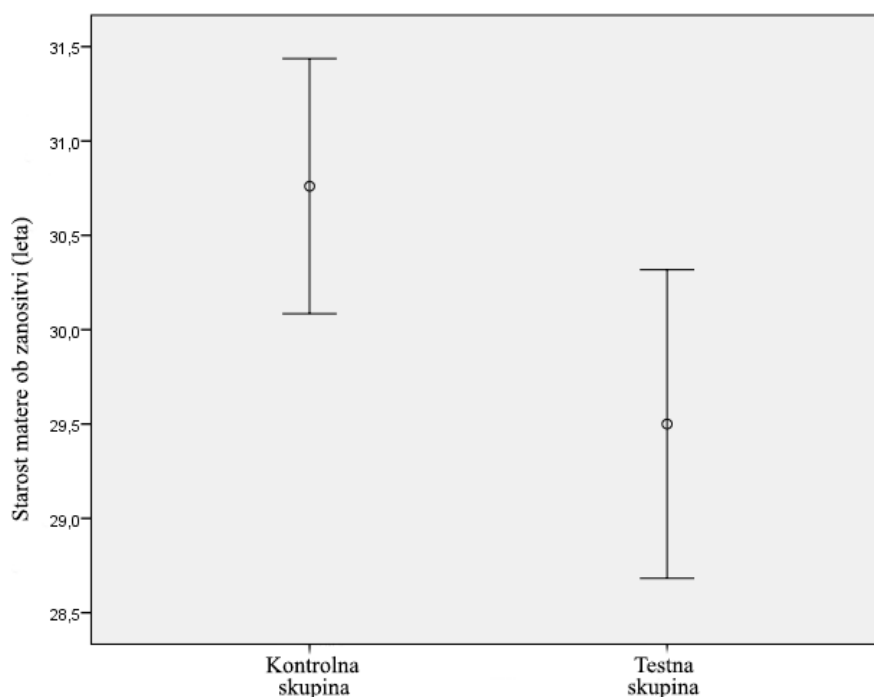
4.2.1 STAROST MATERE OB ZANOSITVI

V spodnji preglednici (Preglednica 3) so zbrani podatki za spremenljivko starost matere ob zanositvi. Iz tabele je razvidno, da se povprečna starost ob zanositvi med TS in KS razlikuje.

PREGLEDNICA 3: Podatki za KS in TS za spremenljivko starost matere ob zanositvi.

STAROST MATERE OB ZANOSITVI			
Skupina	Št. preiskovank	Povprečna starost	Standardna deviacija
KS	192	30,76	4,749
TS	150	29,5	5,066

Poleg tega smo izrisali tudi graf (Graf 2), ki prikazuje razliko v povprečni starosti mater med skupinama.



GRAF 2: Starost matere ob zanositvi v TS in KS. Točke prikazujejo povprečne vrednosti, ročaji pa 95% interval zaupanja.

Nekateri avtorji navajajo, da obstaja linearna povezanost med materino starostjo in pojavom srčnih napak. Z višjo starostjo naj bi torej bilo povečano tveganje za srčne napake. Drugi avtorji pa navajajo U povezanost, kjer naj ni bilo večje tveganje pri mlajših in starejših materah, kar bi lahko delno razložilo naše rezultate (32). Kljub temu, da je v naši študiji starost matere med skupinama statistično različna, ni tako zelo velika, saj razlika znaša le dobro leto. Vzrok za višjo starost mater v KS bi lahko bil tudi posledica načina zbiranja vzorcev. KS namreč vsebuje le podatke novorojencev, rojenih v letih 2015 in 2016, TS pa poleg podatkov novorojencev vsebuje pretežno podatke otrok, ki so bili v času izvajanja študije starejši (0–18 let). Ker so se v preteklosti ženske v povprečju prej odločale za nosečnost, bi bil to lahko razlog za nižjo starost mater v TS. Starost mame so kot dodatno spremenljivko analizirali v več študijah. V dveh študijah v ZDA so ugotovili, da starost matere ne vpliva na pojavnost CHD (33, 34).

Povezavo med prisotnostjo CHD in starostjo matere ob porodu so analizirali s študijo v Angliji. Pri izvedbi študije so uporabili podatke, ki so jih pridobili iz registra, v katerem so zbrani podatki o prirojenih anomalijah. Analizirali so podatke primerov med letoma 1998 in 2013. Starosti mater so razvrstili v pet kategorij (< 20 , 20–24, 25–29, 30–34 ter ≥ 35). Z

rezultati niso dokazali, da bi višja starost matere vplivala na pojav CHD. Nekoliko večje tveganje so dokazali za prisotnost skupnega arterijskega debla, odprtega Botallovega voda in stenoze pulmonalne zaklopke. Pri mamah, starih ≥ 35 let, pa je bila nekoliko večja pojavnost enojnega prekata (35).

Vpliv starosti na pojav CHD so analizirali tudi v Atlanti. Njihov cilj je bil ugotoviti, ali višja starost matere vpliva na večjo pojavnost CHD. Poleg starosti so analizirali še druge potencialne dejavnike. Študijo so zaključili z ugotovitvijo, da posamezne vrste CHD lahko povezujemo z višjo starostjo matere, še posebej, ko so te starejše od 35 let. Tveganje naj bi bilo pri teh 20 % višje kot pri mlajših od 35 let (32).

Z Mann-Whitneyevim U-testom smo analizirali vse ostale testirane spremenljivke, ki se ne porazdeljujejo normalno. Podatki so zbrani v preglednici (Preglednica 4):

PREGLEDNICA 4: Rezultati statistične analize nenormalno porazdeljenih spremenljivk (Mann-Whitneyjev U test)

Mann-Whitneyjev U-test			
SPREMENLJIVKA	Mediana (min – max)		P
	KS	TS	
Višina matere (cm)	167,0 (152,0 - 186,0)	167,0 (146,0 - 190,0)	0,970
Teža matere (kg)	62,0 (40,0 - 116,0)	64,0 (43,0 - 116,0)	0,860
Število nosečnosti	1,5 (1 - 6)	2 (1 - 12)	<0,001
Število živorojenih otrok	1 (1 - 4)	2 (1 - 12)	<0,001
Število splavov	0 (0 - 4)	0 (0 - 3)	0,134
Mesečni vnos metionina (g)	47,0 (18,0 - 847,0)	44,0 (0,0 - 488,0)	0,299
Mesečni vnos folne kisline (μg)	22987,0 (7766,0 - 511393,0)	21892,0 (0,0 - 333156,0)	0,615
BMI	22,14 (16,44 - 44,75)	22,23 (17,43 - 39,41)	0,482

Pri številu nosečnosti in številu živorojenih otrok smo dokazali, da se spremenljivki med TS in KS razlikujeta ($p < \alpha$; $\alpha = 0,05$) – modro obarvani polji v preglednici 4.

4.2.2 VIŠINA MATERE

Z rezultati statistične analize smo dokazali, da se višina matere med TS in KS skupino ne razlikuje. Podobno so dokazali tudi v študiji v Kaliforniji. Izvedli so študijo v kateri so iskali

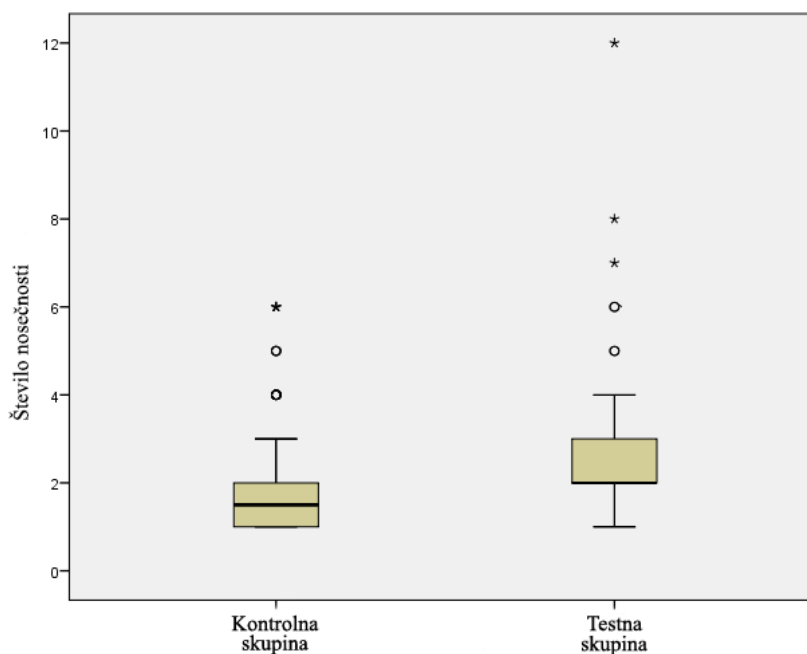
povezavo med BMI, telesno višino in pojavom srčnih napak ter drugih prirojenih napak. Z rezultati niso dokazali značilne povezave med povišanim BMI matere ter srčnimi napakami pri otrocih (36).

4.2.3 TEŽA MATERE

Z rezultati statistične analize smo dokazali, da se teža matere med TS in KS skupino ne razlikuje. Povišano telesno težo povezujemo s višjim rezultatom BMI, o katerem je nekaj več povedano v nadaljevanju magistrske naloge. Opisanih je tudi nekaj študij, ki povezujejo povišan BMI z večjim tveganjem za CHD (33, 34).

4.2.4 ŠTEVILO NOSEČNOSTI

Pri številu nosečnosti smo dokazali, da se spremenljivka med skupinama razlikuje, kar je lepo razvidno tudi v spodnjem kvantilnem diagramu (Graf 3). Matere v TS so imele večje število nosečnosti kot tiste v KS. V ZDA so v eni izmed študij dokazali, da ni statistično značilne razlike med skupinama v številu nosečnosti (33).



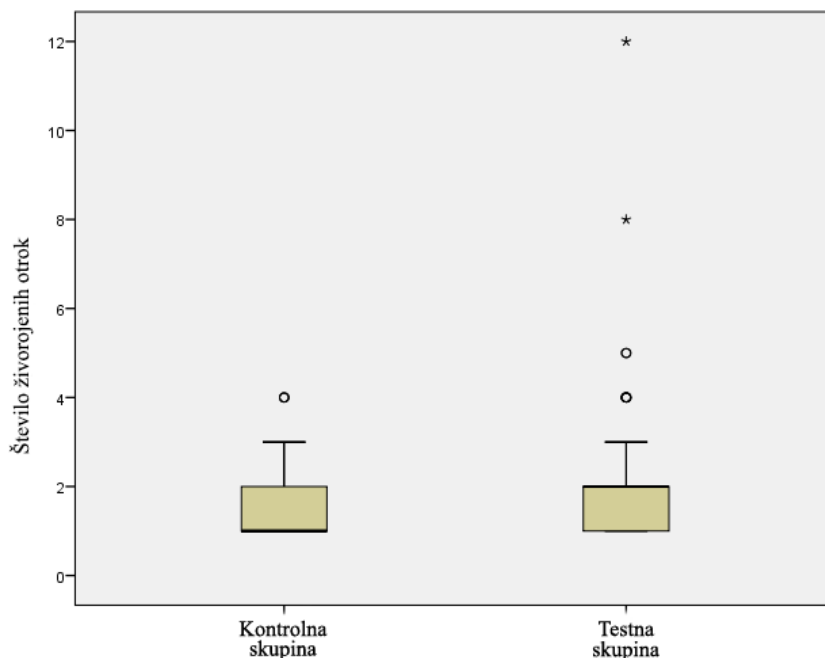
GRAF 3: Kvantilni diagram za število nosečnosti.

○ - izstopajoče vrednosti (izven 1,5-kratnega interkvartilnega razmika)

* - ekstremne vrednosti (izven 3-kratnega interkvartilnega razmika)

4.2.5 ŠTEVILO ŽIVOROJENIH OTROK

Pri številu živorojenih otrok smo tudi dokazali razliko med TS in KS. Matere v TS so imele večje število živorojenih otrok kot tiste v KS (Graf 4). Študije, ki bi to spremenljivko analizirale, nismo zasledili.



GRAF 4: Kvantilni diagram za število živorojenih otrok.

○ - izstopajoče vrednosti (izven 1,5-kratnega interkvartilnega razmika)

* - ekstremne vrednosti (izven 3-kratnega interkvartilnega razmika)

4.2.6 ŠTEVILO SPLAVOV

Po analizi števila splavov nismo ugotovili razlike med TS in KS. V Washingtonu so analizirali kajenje pri nosečnicah. Med drugimi spremenljivkami so preučevali tudi zgodovino splavov pri nosečnicah. Med TS in KS niso dokazali statistično značilne razlike med skupinama v številu splavov (37).

4.2.7 MESEČNI VNOS METIONINA

Iz rezultatov statistične analize vidimo, da med skupinama ni bilo razlike v mesečnem vnosu Met. Študij, ki bi preučevale povezavo med vnosom Met in pojavom CHD, nismo zasledili.

4.2.8 MESEČNI VNOS FOLNE KISLINE S HRANO

Kot smo že v uvodu napisali, ima folna kislina pomembno vlogo, saj preprečuje tveganje za CHD. S statistično analizo pa smo dokazali, da med TS in KS ni statistično značilne razlike v vnosu folne kisline s hrano. V nadaljevanju naloge je opisano nekaj več o vnosu folatov v obliki prehranskih dodatkov, saj smo dokazali povezavo med vnosom folatnih pripravkov in prisotnostjo CHD.

4.2.9 BMI

Iz rezultatov statistične analize je razvidno, da se BMI med skupinama ne razlikuje. Iz tega sklepamo, da debelost matere nima vpliva na prisotnost povečanega tveganja za CHD pri otroku.

V zadnjih letih močno narašča število nosečnic, ki so debelejše oziroma imajo povečan BMI. Med letoma 1993 in 2003 se je v ZDA delež nosečnic, ki imajo povečan BMI (članek ne navaja mejne vrednosti BMI, ki bi pomenil povečano tveganje) dvignil s 13 % na 22 %. S tem so povezane številne težave, kot so diabetes, povišan krvni pritisk ter druge. Številne študije so pokazale, da je povišan BMI povezan s prirojenimi okvarami novorojenčkov (33). V opisani študiji so analizirali povezavo, kako prednosečniška teža matere vpliva na CHD pri otroku. Izvedli so študijo primerov in kontrol, podatke pa so zbrali v več državah ZDA. Analizirani podatki so bili zelo heterogeni glede na tip srčne okvare. BMI so razdelili v pet kategorij, v katere so razvrščali preiskovanke. Poleg BMI so bile analizirane še dodatne spremenljivke, ki bi lahko vplivale na tveganje za CHD. Ugotovili so, da je bilo več mater s prekomerno telesno težo v TS kot pa v KS. Zaključili so z ugotovitvijo, da je $BMI \geq 25,0$ povezan z večjim tveganjem za CHD (33).

Znano je, da bi lahko debelost povečala tveganje za prisotnost srčnih napak, ni pa nobenih utemeljitev, ki bi to lahko potrdile. Niti ni znan BMI, ki bi določal mejo za večje oziroma manjše tveganje za CHD. V ta namen so v eni izmed študij želeli ugotoviti, ali bi lahko debelost oziroma zvišan BMI pomenil večje tveganje za CHD. Podatke so zbrali iz registra v New Yorku, v katerem so bile zapisane malformacije novorojenčkov. V KS so bili zdravi novorojenčki, v TS pa novorojenčki s CHD. Pred samo študijo so definirali pet skupin glede na BMI. Rezultati študij so pokazali, da debelost vpliva na povečano tveganje za CHD. Preiskovanke z indeksom BMI 30–39,9 so imele OR 1,11 in 95% CI 1,04–1,20. Preiskovanke z indeksom BMI ≥ 40 pa so imele razmerje obetov (OR) 1,33 in 95% CI 1,15–

1,54. Po koncu študije so indeks BMI ≈ 30 postavili za mejo tveganja. Bolj kot je indeks BMI nad 30, bolj je visoko tveganje za srčno napako (34).

V nadaljevanju magistrske naloge smo analizirali kategorične spremenljivke s pomočjo Fisherjevega natančnega testa, s katerim smo ugotavljali, ali med spremenljivkama obstaja povezava. Analizirane kategorične spremenljivke so bile kajenje, izobrazba, družinska anamneza, spol otroka, gestacijski diabetes, druge kronične bolezni, protiepileptična zdravila, druga zdravila, zvišana telesna temperatura, uporaba savne, vnos folatov in vnos drugih prehranskih dodatkov.

4.2.10 KAJENJE

PREGLEDNICA 5: Razlike v kadilskem statusu matere v kontrolni in testni skupini.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Kadilski status matere	Nekadilka	112 (56,3 %)	82 (54,7 %)
	Kadilka	23 (11,6 %)	31 (20,7 %)
	Bivša kadilka	64 (32,2 %)	37 (24,7 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,047$			

PREGLEDNICA 6: Kajenje v času nosečnosti v kontrolni in testni skupini.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Kajenje v nosečnosti	NE	176 (88,9 %)	126 (86,9 %)
	DA	22 (11,1 %)	19 (13,1 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,615$			

Iz analiziranih rezultatov je razvidno, da obstaja povezava ($p < \alpha$; $\alpha = 0,05$) med kajenjem matere in CHD pri otroku. Zanimivo je, da smo povezavo potrdili samo med CHD otroka in kadilskim statusom matere (Preglednica 5), ne pa tudi s kajenjem v času nosečnosti (Preglednica 6). Večina kadilk je namreč v času nosečnosti prenehala kaditi, kar je lahko vzrok za take rezultate. Mogoče je, da je kadilski status matere bolj relevanten za statistično analizo kot njena izjava o kajenju med nosečnostjo. Za to obstajata dva razloga:

1. Kajenje v nosečnosti je v družbi obsojano (stigmatizirano), zato je mogoče, da kadilke niso podale resničnih podatkov.
2. Večina žensk izve za nosečnost, ko je razvoj pomembnih organov že v teku, zato je mogoče, da so kadilke v naši skupini preiskovank s kajenjem prenehale prepozno.

Cigaretni dim je sestavljen iz toksičnih in teratogenih snovi (nikotin, ogljikov monoksid in policiklični aromatski ogljikovodiki), ki škodijo razvoju ploda. Te snovi imajo negativen učinek pri nastajanju jajčec in semenčic. Izvedenih je bilo več študij, ki so iskale povezavo med kajenjem v nosečnosti in pojavom prirojenih napak, kot so srčne napake, okvare živčnega sistema, napake v razvoju obraza in ustne votline, anorektalne anomalije ter napake v razvoju udov (38).

Izpostavljenost cigaretnemu dimu povzroči nezadostno delovanje placente, kar povzroči hipoksijo in neustrezen razvoj kardiovaskularnega sistema. Ogljikov monoksid in nikotin preideta placento in povzročita nastanek karboksihemoglobina, ki ovira prenos kisika (37). Kitajska je največja proizvajalka in uporabnica tobaka. Leta 2009 so zasnovali študijo vrste primer-kontrola, s katero so ugotavljali vpliv genov in drugih dejavnikov na pojav CHD. V članku so se osredotočili na vpliv kajenja v obdobju pred zanositvijo in zgodnjo nosečnostjo. Močno povezavo med kajenjem in CHD so odkrili pri zelo aktivnih kadilcih (OR 8,16 in 95% CI 1,13–58,84). Pri zelo aktivnih kadilcih so odkrili tudi visoko tveganje za pojav prirojene obstrukcije vtoka v levi prekat (OR 13,12 in 95% CI 2,55–67,39). Med ventrikularnim septum defektom (VSD) in kajenjem niso našli povezave (OR 1,57 in 95% CI 0,23–10,73) (38).

V študiji, ki jo je izvedel Wasserman s sodelavci, so ugotovili, da kajenje očeta in matere predstavlja tveganje za CHD pri otroku (OR 1,90 in 95% CI 1,20–3,10) (38).

Ena od študij je bila opravljena v Washingtonu, kjer so izvedli retrospektivno študijo primerov in kontrol. Analizirali so otroke s CHD. Podatke, potrebne za študijo, so dobili v rojstnih listih in podatkovnih bazah. Potencialne podatke za TS za analizo so vzeli med letoma 1989 in 2011. Tem so določili fenotip ali subfenotip. Glede na obliko bolezni so podatke razvrstili v skupine. Podatki za KS so bili izbrani naključno. Ustrezni podatki za statistično analizo je bilo za TS 14128, za KS pa 60938. Ravno tako so zbrali tudi podatke o kajenju in jih razvrstili v več skupin glede na število pokajenih cigaret na dan ter podatek o številu pokajenih cigaret v prvem trimesečju nosečnosti. Poleg kadilskega statusa so analizirali še dodatne spremenljivke, ki bi lahko imele vpliv na prisotnost CHD: starost

matere, spol otroka, vera, izobrazba, diabetes in druge spremenljivke. Po izvedbi linearne regresije so ugotovili, da vsaka dodatno pokajena cigareta v prvem trimesečju poveča tveganje za 1,03 (95% CI 1,02–1,03; $p < 0,001$). Po statistični analizi so dobili tudi podatke o tem, da je bilo več nedonošenčkov v TS (22,0 %) kot KS (6,1 %), da je bilo v TS več novorojenčkov z nižjo porodno težo (TS: 18,4 %; KS: 4,0 %) in da je bilo v TS več primerov mam s predgestacijskim in gestacijskim diabetesom (pregestacijski diabetes: TS 2,3 %, KS 0,5 %; gestacijski diabetes: TS 5,5 %, KS 4,1 %). V TS je bila večja prevalenca primerov CHD (OR 1,19 in 95% CI 1,13–1,26). Poleg tega so iz rezultatov ugotovili tudi to, da je večja prevalenca otrok s CHD pri mamah kadilkah, ki so starejše od 35 let. Pri teh je bilo OR 1,43 (95% CI 1,15–1,78), pri mlajših mamah kadilkah (≤ 35 let) pa je bil OR 1,13 (95% CI 1,05–1,22) (37).

V eni izmed študij, ki so jo izvedli v New Yorku, so ugotavljali, kako BMI vpliva na prisotnost tveganja za srčno napako pri novorojenčku. V študijo so vključili tudi druge spremenljivke, med katerimi je bil tudi status kajenja. Rezultati niso dokazali statistične razlike med TS in KS (34).

4.2.11 IZOBRAZBA MATERE

PREGLEDNICA 7: Razlike v stopnji izobrazbe matere med KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Izobrazba	Osnovna šola	3 (1,5 %)	11 (7,3 %)
	Poklicna šola	62 (31,2 %)	70 (46,7 %)
	Srednja šola	12 (6 %)	8 (5,3 %)
	Višja strokovna šola	24 (12,1 %)	20 (13,3 %)
	Univerza	83 (41,7 %)	36 (24,0 %)
	Magisterij ali doktorat	15 (7,5 %)	5 (3,3 %)
Fisherjev natančni test: $p < 0,001$			

Z rezultati statistične analize smo dokazali, da obstaja povezava med izobrazbo matere in CHD pri otroku ($p < \alpha$; $\alpha = 0,05$). V TS je večji delež mater z nižjo stopnjo izobrazbe kot v KS, medtem ko je v KS višji delež mater s končano univerzitetno ali višjo stopnjo izobrazbe (Preglednica 7).

Na Kitajskem so izvedli študijo, kjer so primarno ugotavljali, kako kadilski status vpliva na prisotnost CHD. V študijo so poleg spremenljivke kajenja vključili tudi druge spremenljivke, med katerimi je bila tudi izobrazba. Iz statistično obdelanih podatkov so ugotovili, da obstaja razlika med stopnjo izobrazbe in deležem primerov s CHD. V skupini, kjer je bila izobrazba matere nižja od srednješolske, je bil večji delež otrok s srčno napako. V KS je bilo 34,8 % primerov, v TS pa 15,3 % primerov ($p < 0,0001$) (38).

4.2.12 DRUŽINSKA ANAMNEZA

PREGLEDNICA 8: Družinska anamneza prirojenih srčnih napak v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Družinska anamneza CHD	Negativna	191 (96,0 %)	117 (78,0 %)
	Pozitivna	8 (4,0 %)	33 (22,0 %)
Fisherjev natančni test: $p < 0,001$			

Dokazali smo, ima družinska anamneza CHD statistično značilno povezavo s tveganjem za CHD ($p < 0,001$; $\alpha = 0,05$). Vidimo, da je v TS veliko večji delež mater (22,2 %) s pozitivno anamnezo srčne napake v družini kot v KS (4 %) (Preglednica 8).

Nosečnice, ki so se rodile s CHD, imajo večje tveganje, da bodo rodile otroka s CHD (8).

V študiji v ZDA so ugotavljali, kako prednosečniška teža matere vpliva na CHD. Poleg te spremenljivke so v študijo vključili tudi druge spremenljivke, ki bi lahko vplivale na prisotnost srčne napake. Ena od dodatnih spremenljivk je bila tudi družinska anamneza. Po statistični analizi podatkov so ugotovili, da pozitivna družinska anamneza močno poveča tveganje za rojstvo otroka s CHD (OR 2,87; 95% CI 2,19–3,77) (33).

4.2.13 SPOL OTROKA

PREGLEDNICA 9: Razlike v spolu otroka med TS in KS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Spol otroka	Deček	113 (56,8 %)	87 (58,0 %)
	Deklica	86 (43,2 %)	63 (42,0 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,828$			

Iz rezultatov (Preglednica 9) vidimo, da je vrednost $p = 0,828$ ($p > \alpha$) iz česar smo sklepali, da med spolom otroka in CHD ni povezave.

V New Yorku so v eni izmed študij ugotavljali, kako BMI vpliva na prisotnost tveganja za srčno napako pri novorojenčku. V tej študiji so analizirali, ali ima vpliv tudi spol otroka. Ugotovili so, da ni povezave med spolom otroka in CHD (34).

V Washingtonu so v študiji primarno ugotavljali vpliv kajenja na prisotnost CHD in hkrati so v študiji analizirali tudi druge spremenljivke, med katerimi je bil tudi spol otroka. Tudi v tej študiji niso dokazali statistično značilne razlike med TS in KS. V TS je bilo 52,7 % dečkov in 47,3 % deklic. V KS pa je bilo 51,2 % dečkov in 48,8 % deklic (37).

4.2.14 GESTACIJSKI DIABETES

PREGLEDNICA 10: Razlike v pojavnosti gestacijskega diabetesa med KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Gestacijski diabetes	NE	171 (85,9 %)	134 (89,3 %)
	DA	28 (14,1 %)	16 (10,7 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,416$			

Rezultati statistične analize so pokazali, da je $p > \alpha$ pri $\alpha = 0,05$ (Preglednica 10). Posledično smo sklepali, da med testiranima spremenljivkama ni povezave.

V študiji, ki so jo izvedli v Washingtonu, so primarno ugotavljali vpliv kajenja na prisotnost CHD. Poleg kajenja so analizirali tudi druge spremenljivke, med katerimi sta bila analizirana tudi pregestacijski in gestacijski diabetes. Podatki so pokazali, da je bilo več mater z diabetesom v TS. V TS je bilo 2,3 % primerov s pregestacijskim diabetesom in 5,5 % primerov z gestacijskim diabetesom. V KS so bili deleži nekoliko nižji in sicer, 0,5 % primerov s pregestacijskim in 4,1 % primerov z gestacijskim diabetesom (37).

4.2.15 DRUGE KRONIČNE BOLEZNI PRI MATERI

PREGLEDNICA 11: Prisotnost kronične bolezni pri materi v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Druge kronične bolezni	NE	184 (92,5 %)	123 (82,0 %)
	DA	15 (7,5 %)	27 (18,0 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,004$			

Dokazali smo, da imajo druge kronične bolezni matere vpliv na pojavnost CHD pri otroku. To smo dokazali s Fisherjevim natančnim testom in vrednostjo $p = 0,004$ s čimer smo potrdili povezavo med CHD otroka in drugimi kroničnimi boleznimi mater. V TS je bil večji delež (18 %) preiskovank, ki imajo druge kronične bolezni kot preiskovanke v KS (7,5 %) (Preglednica 11).

Znano je, da imajo kronične bolezni matere vpliv na CHD. Med te bolezni lahko prištevamo sladkorno bolezen tipa 1 in 2, hipertenzijo, srčne bolezni, bolezni ščitnice, anemije, epilepsijo in motnje drugih tkiv (8).

Ena od študij, s katero so raziskovali, ali kronične bolezni vplivajo na prisotnost CHD, je bila izvedena na Tajvanu. Podatke za študijo so dobili iz različnih podatkovnih baz zdravstvenih programov. Študija je potekala med letoma 2004 in 2010. Vključitveni kriterij za študijo je bil gestacijska starost nad 22 tednov in porodna masa najmanj 500 g. Kronična bolezen nosečnice je bila diagnosticirana pred nosečnostjo. Kronične bolezni nosečnic so bile: sladkorna bolezen, hipertenzija, srčna bolezen, bolezen ščitnice, anemija, epilepsija, psihična motnja ali druga tkivna bolezen. Na pojav CHD sta signifikantno vplivala le mamina CHD (OR 6,72 in 95% CI 4,06–11,12) in sladkorna bolezen tipa 2 (OR 2,80 in 95% CI 2,04–3,85) (8).

V študiji, ki so jo izvedli v New Yorku, so tudi dokazali, da imajo sladkorne bolnice večje tveganje za rojstvo otroka s CHD. V tej študiji so primarno ugotavljali, kako BMI vpliva na prisotnost tveganja za srčno napako. Poleg tega so ugotavljali tudi, kakšen vpliv imajo drugi parametri. Testiranih je bilo 7579 sladkornih bolnic, od katerih je imelo 187 testiranih otroka s CHD, kar predstavlja 2,5 % primerov. V KS je bilo testiranih 56716 preiskovank. Srčna napaka na potomcih se je izrazila pri 412 preiskovankah, kar predstavlja 0,7 %. Dokazali so, da ima obstoječa sladkorna bolezen vpliv na tveganje za nastanek CHD pri otroku (34).

4.2.16 PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA V NOSEČNOSTI

PREGLEDNICA 12: Jemanje protiepileptičnih zdravil v nosečnosti v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Protiepileptična zdravila v nosečnosti	NE	198 (99,5 %)	149 (99,3 %)
	DA	1 (0,5 %)	1 (0,7 %)
Fisherjev natančni test: $p = 1,000$			

Epilepsija je kronična nevrolška bolezen s prevalenco 4–10 ljudi na 1000 ljudi. Bolezen se zdravi s protiepileptičnimi zdravili, ki pa so v nosečnosti nevarne. Pri novorojenčkih, katerih mame imajo epilepsijo, se tveganje za prirojene nepravilnosti pri njih dvigne iz 1–2% na 4–9%. Nosečnost je torej potrebno skrbno spremljati. Zdravila, ki vsebujejo fenitoin, povezujejo z večjim tveganjem za CHD, zdravila, ki vsebujejo valproat, karbamazepine in barbiturate, pa povezujejo z večjim tveganjem za poškodbe nevrčne cevi. Znano je, da lahko pride tudi do urogenitalnih in skeletnih poškodb (39).

S statistično analizo naših podatkov nismo dokazali povezave med CHD in jemanjem protiepileptičnih zdravil v nosečnosti verjetno zato, ker sta v KS in TS skupaj le dve materi jemali tovrstna zdravila v času nosečnosti (Preglednica 12).

4.2.17 DRUGA ZDRAVILA MED NOSEČNOSTJO

PREGLEDNICA 13: Jemanje drugih zdravil v nosečnosti v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Druga zdravila med nosečnostjo	NE	106 (53,3 %)	70 (46,7 %)
	DA	93 (46,7 %)	80 (53,3 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,236$			

Med CHD in vnosom drugih zdravil v nosečnosti (Preglednica 13) prav tako nismo ugotovili statistično značilne povezave ($p > \alpha$; $\alpha = 0,05$). Zdravila, ki so jih preiskovanke jemale, so bile izdane brez recepta in na recept. Analiza posameznih skupin zdravil je bila izvedena v sklopu druge študije (Kek, et al., 2017) (40) in ni predmet te magistrske naloge.

4.2.18 PRISOTNOST ZVIŠANE TELESNE TEMPERATURE PRI MATERI V 1. TRIMESEČJU NOSEČNOSTI

PREGLEDNICA 14: Prisotnost zvišane telesne temperature pri materi v 1. trimesečju nosečnosti v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Prisotnost zvišane telesne temperature	NE	187 (94,0 %)	143 (95,3 %)
	DA	12 (6,0 %)	7 (4,7 %)
Fisherjev natančni test: p = 0,640			

Iz rezultatov statistične analize (Preglednica 14) vidimo, da ni bilo povezave med CHD in prisotnostjo zvišane telesne temperature pri materi v 1. trimesečju nosečnosti.

Na Finskem so izvedli študijo, s katero so ugotavljali, ali povišana temperatura vpliva na CHD. Poleg zvišane telesne temperature ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) so analizirali tudi vpliv uporabe savne in zanositev v poletih mesecih, ko so višje temperature. Analizirali so TS in KS. V analizo so vključili vse rojene otroke, tudi mrtvorojene, pri katerih so dokazali srčne napake pred prvim letom starosti. Študija je potekala med letoma 1982 in 1984. S statistično analizo podatkov so ugotovili, da je bilo v TS več primerov povišane telesne temperature pri materi v času nosečnosti ($\geq 38^{\circ}\text{C}$). Dokazali so višje tveganje za prisotnost atrijske septalne napake in hipoplastičnost levega prekata (41).

Ali ima zvišana telesna temperatura vpliv na prisotnost srčnih napak, so ugotavljali tudi v madžarski študiji. Ugotovili so, da je v primeru uživanja multivitaminskih dodatkov in prisotne vročinske bolezni tveganje za srčno napako manjše (OR 1,3; 95% CI 0,6–3,0). Večje tveganje je bilo pri tistih preiskovankah, ki so imele vročinsko bolezen in niso uživale multivitaminskih dodatkov (OR 2,8; 95% CI 1,7–4,5) (42).

4.2.19 UPORABA SAVNE V 1. TRIMESEČJU NOSEČNOSTI

PREGLEDNICA 15: Uporaba savne v začetku nosečnosti v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Uporaba savne	NE	194 (97,5 %)	149 (99,3 %)
	DA	5 (2,5 %)	1 (0,7 %)
Fisherjev natančni test: p = 0,242			

S statistično analizo nismo pokazali povezanosti uporabe savne s pojavnostjo CHD (Preglednica 15).

V študiji na Finskem so ugotavljali, ali lahko zvišana temperatura vpliva na pojav CHD. Med drugim so preučevali tudi uporabo savne. Po koncu študije so ugotovili, da ni bilo statistično značilne razlike med TS in KS v uporabi savne med nosečnostjo. Analizirali so več tipov srčnih napak, a so bili v vseh podskupinah rezultati primerljivi med TS in KS (41).

4.2.20 VNOS PRIPRAVKOV S FOLATI

PREGLEDNICA 16: Razlike v vnosu folatnih pripravkov med KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Vnos pripravkov s folati	Začetek prej kot 3 tedne po zanositvi	114 (58,8 %)	65 (43,6 %)
	Začetek kasneje kot 3 tedne po zanositvi	62 (32,0 %)	107 (30,2 %)
	Ni vnosa	18 (9,3 %)	57 (26,2 %)
Fisherjev natančni test: $p < 0,001$			

Ugotovili smo, da obstaja povezava med vnosem folatnih pripravkov in prisotnostjo CHD, saj je vrednost $p < 0,001$. Pomembno je, da nosečnice povečajo vnos folatov že pred samo zanositvijo. Vidimo, da je bilo v TS več mater (26,2 %), ki sploh niso uživale folatih pripravkov v nosečnosti, kot v KS. Ravno tako je bil v KS večji delež mater, ki so z uživanjem folatnih pripravkov začele zelo zgodaj (Preglednica 16). Iz tega smo sklepali, da imajo ti res zelo pomembno vlogo in znižajo verjetnost srčnih napak in drugih nepravilnosti v razvoju.

Večji vnos folne kisline in drugih dodatkov, ki vsebujejo folno kislino, zniža tveganje za prisotnost okvar nevralne cevi in srčnih okvar. To so dokazali v eni od študij, kjer so preiskovanke razdelili v tri skupine. V eni skupini preiskovanke niso uživale folne kisline, v drugih dveh skupinah pa so prejemale različne odmerke folne kisline (1,0 ali 2,5 g). Dokazali so, da so preiskovanke, ki so uživale folno kislino, imele manjše tveganje za rojstvo otroka s srčno napako (42). Izvedena je bila tudi študija, s katero so želeli ugotoviti, ali se poveča

tveganje za CHD pri vnosu snovi, ki so antagonisti folne kisline. Ugotovili so, da se tveganje 2-krat poveča (43).

V eni od študij so izvedli metaanalizo podatkov več predhodnih študij. Študijo so pričeli s 1606 članki, vendar so na koncu analizirali le 18 člankov, ki so ustrezali vsem vključitvenim kriterijem. Analizirane študije so bile izvedene med letoma 1995 in 2013. Ugotovili so signifikanten upad tveganja za CHD v primeru uživanja pripravkov, ki so vsebovali folno kislino. Postavili so tudi hipotezo, da oslABLJena presnova folatov in/ali Hcy moti razvoj srca in potencialno lahko vpliva tudi na moten razvoj živčnih celic. Pomembna ugotovitev je bila tudi ta, da morajo matere z višjim BMI še nekoliko bolj povečati dnevni vnos folatov (44).

4.2.21 VNOS DRUGIH PREHRANSKIH DODTAKOV

PREGLEDNICA 17: Vnos multivitaminskih, mineralnih in omega 3 prehranskih dodatkov v KS in TS.

		Skupina	
		KS - n (%)	TS - n (%)
Vnos drugih prehranskih dodatkov	Noben dodatek	158 (79,4 %)	109 (72,7 %)
	Multivitamini	21 (10,6 %)	11 (7,3 %)
	Minerali (Mg, Ca)	12 (6,0 %)	27 (18,0 %)
	Omega 3	6 (3,0 %)	0 (0,0 %)
	Drugi ali neznani	2 (1,0 %)	3 (2,0 %)
Fisherjev natančni test: $p = 0,001$			

Tudi drugi prehranski dodatki imajo pomembno vlogo. S statistično analizo smo pokazali, da obstaja razlika med TS in KS pri uživanju le-teh med nosečnostjo. Največja razlika med TS in KS je bila pri vnosu mineralov (Mg in Ca) (Preglednica 17). S tem smo dokazali, da imajo minerali negativen učinek in zvišajo tveganje za prisotnost CHD.

Omega 3 maščobne kisline so esencialne maščobne kisline in jih moramo v telo vnesti s hrano. Imajo številne pomembne funkcije, saj jih potrebujemo za normalen razvoj, pomembne so za protivnetno delovanje ter imajo številne koristne učinke pri boleznih srca in ožilja. Nekatere študije so dokazale, da izboljšajo mehanske funkcije srca. Dokazali so tudi, da zmanjšajo ishemične bolezni srca in srčno popuščanje (45). O vnosu omega 3 maščobnih kislin med nosečnostjo ter pojavnostjo CHD nismo zasledili študije, ki bi kazala, ali zniža tveganje za CHD.

Vnos multivitaminov ima pomembno vlogo, saj ti znižajo tveganje za CHD. V madžarski randomizirani kontrolirani študiji ter študiji v Atlanti, ki so jo izvedli na dveh populacijah primerov in kontrol, so ugotavljali kako vpliva vnos multivitaminov (vitamin C, vitamin A, vitamini B, minerali in folna kislina) na pojavnost CHD. V madžarski študiji se je tveganje za napake pri razvoju nevralne cevi in srčnih napak znižalo za 50 %. S študijo v Atlanti pa so dokazali 24–odstotno znižanje tveganja za prisotnost CHD pri preiskovankah, ki so uživale multivitamine (42).

Študij, ki bi analizirale vpliv Mg in Ca na tveganje za srčno napako žal nismo zasledili.

4.2.22 ANALIZA GENOTIPOV IZBRANIH METILTRANSFERAZ

V nadaljevanju smo analizirali vpliv genotipov. Rezultati genotipizacije za posamezne vzorce so zbrani v prilogi (Priloga 3).

V spodnjih preglednicah (Preglednice 18, 19 in 20) so prikazani rezultati statistične analize treh modelov: aditivnega, dominantnega in recesivnega modela.

PREGLEDNICA 18: Analiza aditivnega modela genotipov mater in otrok KS in TS.

SPREMENLJIVKA	Genotip	Skupina		Fisherjev natančni test p
		KS n (%)	TS n (%)	
Materin genotip BHMT	GG	91 (45,7)	64 (43,8)	0,957
	AA	15 (7,5)	11 (7,5)	
	AG	93 (46,7)	71 (48,6)	
Otrokov genotip BHMT	GG	98 (49,5)	64 (43,8)	0,271
	AA	16 (8,1)	19 (13,0)	
	AG	84 (42,4)	63 (43,2)	
Materin genotip GNMT	CC	57 (28,6)	40 (27,2)	0,251
	TT	38 (19,1)	39 (26,5)	
	CT	104 (52,3)	68 (46,3)	
Otrokov genotip GNMT	CC	64 (32,2)	36 (25,2)	0,372
	TT	37 (18,6)	30 (21,0)	
	CT	98 (49,2)	77 (53,8)	
Materin genotip DNMT3B	CC	56 (28,1)	49 (33,6)	0,149
	TT	51 (25,6)	25 (17,1)	
	CT	92 (46,2)	72 (49,3)	
Otrokov genotip DNMT3B	CC	57 (28,6)	52 (35,6)	0,343
	TT	44 (22,1)	26 (17,8)	
	CT	98 (49,2)	68 (46,6)	

PREGLEDNICA 19: Analiza dominantnega modela genotipov mater in otrok KS in TS.

SPREMENLJIVKA	Genotip	Skupina		Fisherjev natančni test p
		KS n (%)	TS n (%)	
Materin genotip BHMT	GG AA + AG	91 (45,7) 108 (54,3)	64 (43,8) 82 (56,2)	0,744
Otrokov genotip BHMT	GG AA + AG	98 (49,5) 100 (50,5)	64 (43,8) 82 (56,2)	0,326
Materin genotip GNMT	CC TT + CT	57 (28,6) 142 (71,4)	40 (27,2) 107 (72,8)	0,809
Otrokov genotip GNMT	CC TT + CT	64 (32,2) 135 (67,8)	36 (25,2) 107 (74,8)	0,185
Materin genotip DNMT3B	CC TT + CT	56 (28,1) 143 (71,9)	49 (33,6) 97 (66,4)	0,289
Otrokov genotip DNMT3B	CC TT + CT	57 (28,6) 142 (71,4)	52 (35,6) 94 (64,4)	0,197

PREGLEDNICA 20: Analiza recesivnega modela genotipov mater in otrok KS in TS.

SPREMENLJIVKA	Genotip	Skupina		Fisherjev natančni test p
		KS n (%)	TS n (%)	
Materin genotip BHMT	GG + AG AA	184 (92,5) 15 (7,5)	135 (92,5) 11 (7,5)	1,000
Otrokov genotip BHMT	GG + AG AA	182 (91,9) 16 (8,1)	127 (87,0) 19 (13,0)	0,151
Materin genotip GNMT	CC + TC TT	161 (80,9) 38 (19,1)	108 (73,5) 39 (26,5)	0,117
Otrokov genotip GNMT	CC + TC TT	162 (81,4) 37 (18,6)	113 (79,0) 30 (21,0)	0,584
Materin genotip DNMT3B	CC + TC TT	148 (74,4) 51 (25,6)	121 (82,9) 25 (17,1)	0,066
Otrokov genotip DNMT3B	CC + TC TT	155 (77,9) 44 (22,1)	120 (82,2) 26 (17,8)	0,346

Iz podatkov vidimo, da so vse vrednosti $p > \alpha$ pri $\alpha = 0,05$, iz česar sledi, da noben izmed testiranih genotipov ne vpliva na nastanek CHD kot izolirani dejavnik tveganja. Največje število p vrednosti $< 0,250$ (modro obarvane vrednosti v tabelah) smo opazili pri recesivnih genetskih modelih, zato smo pri nadaljnji analizi z logistično regresijo upoštevali le-te. V model logistične regresije smo vključili tiste recesivne genetske modele s $p < 0,250$ (otrokov genotip BHMT, mamin genotip GNMT in mamin genotip DNMT3B).

4.3 ANALIZA PODATKOV Z LOGISTIČNO REGRESIJO

Na koncu smo analizirali podatke s pomočjo logistične regresije. Izdelali smo več modelov logistične regresije. Na začetku smo naredili model, v katerega smo vključili le spremenljivke, za katere smo pri analizi kategoričnih spremenljivk dokazali statistično značilno povezanost s CHD: starost matere ob zanositvi, število živorojenih otrok, kajenje matere, družinsko anamnezo, druge kronične bolezni, vnos folatov in vnos drugih prehranskih dodatkov (Preglednica 21). V ta model nismo vključili genotipov. S tem smo želeli ugotoviti kolikšen vpliv imajo okoljski dejavniki. V nadaljevanju smo izdelali še model, v katerega smo poleg zgoraj omenjenih spremenljivk vključili tudi genotipe BHMT, GNMT in DNMT3B. Prav ti so bili ključni v naši nalogi, saj je bil naš cilj ugotoviti, ali ti pomembno vplivajo na prisotnost CHD. V začetni model z genotipi smo vključili tiste recesivne genetske modele, ki so imeli v univariantni analizi $p < 0.250$: otrokov BHMT ter materin DNMT3B in GNMT genotip. Izkazalo se je, da smo glede na rezultate Omnibus testa in Hosmer-Lemeshovega testa dobili bolj ustrezen model, če smo izključili materin genotip GNMT. Končni model logistične regresije je prikazan v preglednici (Preglednica 22).

Kot smo omenili zgoraj, smo se najprej lotili logistične regresije s spremenljivkami brez genotipov. V preglednici 21 so vrednosti, s katerimi smo interpretirali rezultate. Podatki, ki so bili pomembni za našo interpretacijo, so tisti, pri katerih je bila vrednost $p < 0,05$. Te spremenljivke so bile starost matere ob zanositvi, število živorojenih otrok, družinska anamneza, vnos folatov ter minerali (Mg, Ca) – modro obarvana polja v preglednici.

PREGLEDNICA 21: Osnovni model logistične regresije brez genotipskih podatkov.

SPREMENLJIVKA		P	OR - 95% CI (spodnja meja - zgornja meja)
Starost matere ob zanositvi		0,003	0,919 (0,869 - 0,971)
Število živorojenih otrok		< 0,001	2,288 (1,624 - 3,224)
Kajenje matere (ref: Nekadilka)	Kadilka	0,039	2,208 (1,039 - 4,690)
	Bivša kadilka	0,487	0,811 (0,449 - 1,465)
Družinska anamneza pozitivna (ref: negativna)		< 0,001	7,774 (3,189 - 18,952)
Kronične bolezni Da (ref: Ne)		0,253	1,632 (0,705 - 3,777)
Vnos folatov (ref: ni vnosa folatov)	3 tedne pred zanositvijo	0,007	0,363 (0,173 - 0,761)
	3 tedne po zanositvi	0,028	0,400 (0,177 - 0,904)
Drugi prehranski dodatki (ref: ni vnosa)	Multivitamini	0,811	0,890 (0,343 - 2,310)
	Minerali (Mg, Ca)	< 0,001	4,815 (2,037 - 11,379)
	Omega 3	0,999	0,000
	Drugi	0,174	4,280 (0,525 - 34,902)

Iz rezultatov vidimo, da tveganje za prisotnost srčne napake znižata večja starost matere ob zanositvi ter vnos folatov. Pri obeh spremenljivkah je vrednost OR manjša od 1. Večje število živorojenih otrok, pozitivna družinska anamneza in vnos mineralov Mg in Ca pa povečajo tveganje za prisotnost srčne napake. Družinska anamneza je največji dejavnik tveganja, saj je tveganje za prisotnost srčne napake v družinah s pozitivno družinsko anamnezo 7,774-krat večje. Močan vpliv imata tudi Mg in Ca, ki povečata tveganje za 4,815-krat. Študije, ki bi posebej analizirala povezavo med vnosom Mg in Ca ter prisotnostjo CHD, nismo zasledili.

Da ima družinska anamneza vpliv na CHD, smo dokazali že pri univariantni analizi. Dokazali smo statistično značilno povezavo med pozitivno družinsko anamnezo in povečanim tveganjem za CHD. V TS je bil delež testiranih, ki so imeli CHD 22,2 %, v KS pa 4 %.

O vnosu folatov smo že pisali pri univariantni analizi. Tam smo pokazali, da obstaja povezava med manjšim vnosom folatov in prisotnostjo CHD. Folati imajo res zelo pomembno vlogo in znižajo verjetnost srčnih napak in drugih nepravilnosti v razvoju.

O vplivu materine starosti smo že razpravljali pri univariantni analizi. Pri naši analizi smo pokazali, da je tveganje manjše pri starejših. Rezultati več študij niso dokazali, da bi višja starost matere pomenila povečano tveganje za prisotnost CHD.

Pri številu živorojenih otrok nismo zasledili študije, ki bi preučevala to spremenljivko. Vzrok za povečano tveganje pri mlajših mamah bi lahko bil ta, da z nižjo starostjo ob rojstvu prvega otroka korelira tudi nižja izobrazba. Mlade mame so posledično manj poučene o vnosu

folatov in vplivu drugih dejavnikov, ki so pomembni pri znižanju tveganja za prisotnost CHD.

V preglednici 22 smo se osredotočili na interpretacijo rezultatov genotipov. Preostale spremenljivke smo že opisali in so v tem modelu primerljive z že opisanim modelom.

PREGLEDNICA 22: Najustreznejši končni model logistične regresije, ki vključuje okoljske in genetske dejavnike tveganja.

SPREMENLJIVKA		P	OR - 95% CI (Spodnja meja - zgornja meja)
Starost matere ob zanositvi		< 0,001	0,893 (0,841 - 0,949)
Število živorojenih otrok		< 0,001	2,539 (1,768 - 3,647)
Kajenje matere (ref: Nekadilka)	Kadilka	0,215	1,648 (0,748 - 3,623)
	Bivša kadilka	0,498	0,809 (0,437 - 1,495)
Družinska anamneza pozitivna (ref: negativna)		< 0,001	7,947 (3,191 - 19,792)
Kronične bolezni Da (ref: Ne)		0,353	1,502 (0,636 - 3,544)
Vnos folatov (ref: ni vnosa folatov)	3 tedne pred zanositvijo	0,002	0,301 (0,140 - 0,648)
	3 tedne po zanositvi	0,015	0,351 (0,151 - 0,813)
Drugi prehranski dodatki (ref: Ni vnosa)	Multivitamini	0,867	0,921 (0,351 - 2,414)
	Minerali (Mg, Ca)	< 0,001	5,495 (2,225 - 13,394)
	Omega 3	0,999	0,000
	Drugi	0,100	6,616 (0,696 - 62,853)
Otrokov genotip BHMT (recesivni model) AA (ref: GG+AG)		0,019	3,011 (1,197 - 7,572)
Materin genotip DNMT3B (recesivni model) TT (ref: CC+CT)		0,035	0,476 (0,239 - 0,948)

Iz podatkov razberemo, da je pri mamah z dvema mutiranimi aleloma DNMT3B znižano tveganje za prisotnost srčne napake pri otroku. Tveganje pri mutiranem homozigotu TT se zniža za 2-krat. Pri nemutiranem homozigotu CC in mutiranem heterozigotu CT je večje tveganje za prisotnost bolezni. Rezultate je težko interpretirati, saj funkcijske študije omenjenega polimorfizma še niso bile izvedene in zato ni jasno, kako le-ta vpliva na aktivnost DNMT3B.

Študije, ki bi analizirali povezavo med polimorfizmom DNMT3B (rs2424913) in CHD, nismo zasledili. Smo pa zasledili nekaj drugih študij, ki so analizirale omenjeni polimorfizem. Sam polimorfizem povezujejo s številnimi rakavimi obolenji (pljučni karcinom, karcinom dojke, tumor glave in vratu, karcinom črevesja). Kombinacija polimorfizmov DNMT3B -579GT/-149CC je povezana s signifikantnim znižanim

tveganjem za rojstvo otroka z Downovim sindromom (13,46). Heterozigoti CT imajo manjše tveganje za razvoj karcinoma dojke (47).

Spremenjena DNA metilacija naj bi bila osnovni mehanizem pri razvoju srčnih napak. Na spremenjen metilacijski vzorec naj bi vplivala tudi prehrana in izpostavljenost zunanjim dejavnikom. O povezavi med CHD in metilacijo DNA je le malo znanega. Domnevajo, da hipometilacija privede do nestabilnosti kromatina, spremenjenega izražanja genov in celične delitve. Izvedena je bila študija, s katero so želeli ugotoviti, ali je LINE-1 DNA hipometilacija povezana s pojavom CHD. Ugotovili so, da je bila v TS prisotna hipometilacija DNA v primerjavi s KS. Iz tega sledi, da je LINE-1 DNA hipometilacija povezana s povišanim tveganjem za CHD (48).

DNMT3B katalizira prenos metilne skupine in sodeluje pri nastanku metilacijskega vzorca pri razvoju. V eni izmed študij so raziskovali, ali nepravilnost v metilacijskem vzorcu vpliva na pojavnost CHD. Analizirali so vzorce pri prekinjenih nosečnostih. Samo analizo so izvedli na zdravih plodovih, plodovih z izolirano CHD ter plodovih z Downovim sindromom z ali brez CHD. Pri vzorcih kontrol in Downovim sindromov brez CHD ni prišlo do sprememb v metilacijskem profilu. V primeru izoliranih CHD in Downovih sindromov s CHD so bile prisotne spremembe v metilacijskem profilu (5).

Prehrana matere v nosečnosti je zelo pomembna. Pomemben je vnos vitamina A, saj so nekatere študije pokazale, da je z znižanim vnosom vitamina A večje tveganje za razvoj CHD. GATA-4 je pomemben transkripcijski faktor, ki se izraža med razvojem srca. Mutacije GATA-4 vodijo do izoliranih CHD. V sledeči študiji so ugotavljali, kako pomankanje vitamina A vpliva na metilacijski status in izražanje GATA-4. Poleg tega so merili tudi izražanje DNA metiltransferaz, saj imajo tudi te pomembno vlogo pri metilaciji DNA. Izmerili so tudi izražanje DNMT3B, za katerega so ugotovili, da se je znižalo v primeru, ko je bil vnos vitamina A nezadosten. Študijo so izvedli na miškah, ki so jih razdelili v skupine glede na vnos vitamina A. Po končani študiji so ugotovili, da je vnos vitamina A zelo pomemben. V skupini, kjer so miške dobile vitamin A, ni bilo prisotnih CHD. V skupini, kjer miške niso dobile vitamina A, so potrdili različne oblike CHD. Iz tega sledi, da je vnos vitamina A zelo pomemben pri zmanjšanju tveganja za razvoj CHD. Pri analizi metilacijskega vzorca GATA-4 so ugotovili, da so imele miške manjši delež metilacije pri vnosu vitamina A. V primeru manjšega vnosa vitamina A pa je bil delež metilacije povečan (49).

Pri analizi otrokovega genotipa BHMT smo po statistični analizi ugotovili povezanost s pojavnostjo CHD ($p = 0,019$). Mutirani homozigoti AA imajo 3-krat povečano tveganje za prisotnost srčnih napak. Nemutirani homozigoti (divji tip) GG in mutirani heterozigoti AG imajo manjše tveganje za prisotnost bolezni. BHMT katalizira alternativno pot remetilacije Hcy v Met, ki je aktivna v jetrih in ledvicah. BHMT je zelo pomemben med nosečnostjo, saj zniža koncentracijo Hcy. Visoke koncentracije Hcy imajo namreč teratogeni učinek.

Na Medicinski univerzi v Arkasansu so izvedli študijo, v kateri so ugotavljali ali polimorfizem 742G>A (rs3733890) v genu za encim BHMT vpliva na CHD. Predpostavljali so, da polimorfizem v genu za encim BHMT zniža encimsko aktivnost in posledično privede do motnje v ciklu presnove folatov. Analizirali so tudi vpliv debelosti, kajenja in alkohola. V študijo so vključili matere z dojenčki, ki imajo CHD (TS), in matere zdravih otrok (KS). Matere so izbirali tudi glede na predpisane vključitvene in izključitvene kriterije. Ugotovili so, da je 1,82-krat večja verjetnost (95% CI 1,09–3,03) za CHD otrok pri tistih materah, ki imajo BMI ≥ 30 ter imajo prisotnost enega ali dveh alelov A (10).

V Philadelphiji je med letoma 1997 in 2007 potekala študija, s katero so iskali povezavo med devetimi genetskimi različicami, ki so povezane s folati in bi lahko potencialno vplivale na CHD. V analizo so vključili tudi genetski polimorfizem 742G>A v genu za BHMT. Analizirali so le napake leve strani srca; koarktacijo aorte, aortno stenozo in sindrom hipoplastičnega levega srca. Vrednost p za polimorfizem BHMT je bila ravno na meji, saj je znašala 0,06, a je bila mejno pomembna. Rezultati so pokazali, da je genotip AA povezan z zmanjšanim tveganjem za zgoraj navedene srčne napake, glede na genotip GG. V večji študiji (Goldmuntz in sodelavci), ki je bila izvedena kasneje (2008), niso dokazali te povezave. V opisani študiji so zaključili s trditvijo, da polimorfizem BHMT lahko poveča tveganje za srčne napake in da so rezultati predhodne študije najverjetneje lažno pozitivni (9).

5. SKLEPI

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti, ali prisotnost pogostih polimorfizmov v genih za encime BHMT, GNMT in DNMT3B poveča tveganje za nastanek CHD. Zanimalo nas je tudi, ali na nastanek CHD vplivajo tudi dejavniki okolja.

Glavne ugotovitve so:

1. Mlajše matere imajo povečano tveganje za rojstvo otroka s CHD.
2. Večje število živorojenih otrok je povezano z večjo pojavnostjo CHD.
3. Pozitivna družinska anamneza 8-krat poveča tveganje za CHD.
4. Jemanje folatnih pripravkov močno zmanjša tveganje za CHD. Ta učinek je še bolj izrazit pri materah, ki so z jemanjem folatov začele prej kot 3 tedne po zanositvi.
5. Jemanje pripravkov z Mg in Ca poveča tveganje za CHD.
6. Genotip otroka BHMT rs3733890 AA 3-krat poveča verjetnost za nastanek CHD.
7. Materin genotip DNMT3B rs2424913 TT 2-krat zniža tveganje za nastanek CHD pri otroku.

6. LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T, Legan M: Anatomija, histologija in fiziologija, 2. izdaja, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2008: 95-96.
2. Stran na srcu operiranih otrok Slovenije. Dostop: 11.08.2017.
http://regi.si/srcu/src_napake.php
3. Jerše M: Srčne napake, Rdeči križ Slovenije, Ljubljana, 2001: 7-14.
4. Viličnik V: O prirojenih srčnih napakah. ABC Zdravja, 2015, 10 (8), 24-25.
5. Serra-Juhé C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez-Jurado L. A: DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. Epigenetics 2015; 10: 167-177.
6. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4. izdaja, Založba Littera Picta, d.o.o., Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 213.
7. Robida A: Otroške srčne bolezni in prirojene srčne hibe pri odraslih, Mladinska knjiga – Tiskarna, Ljubljana, 1998: 113-115.
8. Chou H, Chiou M, Liang F, Chen L, Lu T, Li C: Association of maternal chronic disease with risk of congenital heart disease in offspring. Cmaj 2016: 1-9.
9. Mitchell E. L, Long J, Garbarini J, Paluru P, Goldmuntz E: Variants of Folate Metabolism Genes and Risk of Left-Sided Cardiac Defects. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2010; 88: 45-53.
10. Hobbs A.C, Cleves M, Karim A.M, Zhao W, MacLeod S.L: Maternal Folate-Related Gene Environment Interactions and Congenital Heart Defects. Obstet Gynecol 2010; 116: 316-322.
11. Wikimedia commons. Dostop: 11.08.2017.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Folic_acid.svg
12. Bohanec P, Dolžan V: Genetski polimorfizmi encimov v presnovni poti folata v zdravi slovenski populaciji. Zdravstveni vestnik 2004; 73: 807-813.
13. Coppede F: The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. Frontiers in Genetics 2015; 6: 1-25.
14. Blom J. H, Smulders Y: Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. J Inherit Metab Dis 2010; 34: 75-81.

15. Imbard A, Benoist J, Blom H: Neural Tube Defects, Folic Acid and Methylation. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2013; 10: 4352-4389.
16. Horning B.D, Suciu R. M, Ghadiri D. A, Ulanovskaya O. A, Matthews M. L, Lum K. M, Backus K. M, Brown S. J, Rosen H, Cravatt B. F: Chemical Proteomic Profiling of Human Methyltransferases. *Journal of the American Chemical Society* 2016; 138: 13335-13343.
17. Ying H, ErJan C, Yue M, JinLu L, RenJi C: BHMT Gene Polymorphisms as Risk Factors for Cleft Lip and Cleft Palate in a Chinese Population. *Biomed Environ Sci* 2011; 24: 89-93.
18. Colomina M. J, Cavallé-Busquets P, Fernàndez-Roig S, Solé-Navais P, Fernandez-Ballart D. J, Ballesteros M, Ueland M. P, Meyer K, Murphy M. M: Maternal Folate Status and the BHMT c.716G>A Polymorphism Affect the Betaine Dimethylglycine Pathway during Pregnancy. *Nutrients* 2016: 1-12.
19. Park I. E, Garrow A. T: Interaction between Dietary Methionine and Methyl Donor Intake on Rat Liver Betaine-homocysteine Methyltransferase Gene Expression and Organization of the Human Gene. *The journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 7816-7824.
20. Garrow A. T: Purification, Kinetic Properties, and cDNA Cloning of Mammalian Betaine-Homocysteine Methyltransferase. *The journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 22831-22838.
21. Shaw M. G, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs B. F, Carmichael L. S, Barcellos F. L, Lammer J. E, Finnell H. R: 118 SNP of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Medical Genetics* 2009; 10: 49.
22. Boyles A. L, Billups A.V, Deak K. L, Siegel D. G, Mehlretter L, Slifer S. H, Bassuk A. G, Kessler J. A, Reed M. C, Nijhout H. F, George T. M, Enterline D. S, Gilbert J. R, Speer M. C, NTD Collaborative Group: Neural Tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114 (10): 1547-1552.
23. Beagle B, Yang T. L, Hung J, Cogger E, A, Moriarty D. J, Caudill M. A: The Glycine N-Methyltransferase (GNMT) 1289 C→T Variant Influences Plasma Total Homocysteine Concentrations in Young Women after Restricting Folate Intake. *The Journal of Nutrition* 2005; 2780-2785.

24. DebRoy S, Kramarenko I. I, Ghose S, Oleinik V. N, Krupenko A. S, Krupenko I. N: A novel Tumor Suppressor Function of Glycine N-Methyltransferase Is Independent of Its Catalytic Activity but Requires Nuclear Localization. Plos one 2013; 8: 1-10.
25. Wang Y, Lin W, Lin Y, Tang F, Chen Y, Chiang E. I: A novel role of the tumor suppressor GNMT in cellular defense against DNA damage. International Journal of Cancer 2013; 134: 799-810.
26. Wang Y, Chen Y, Lin Y, Liu S, Chiang E: GNMT Expression Increases Hepatic Folate Contents and Folate-Dependent Methionine Synthase-Mediated Homocysteine Remethylation. Mol Med 2011; 17: 486-494.
27. Ho V, Ashbury E. J, Taylor S, Vanner S, King D. W: Gene-specific DNA methylation of DNMT3B and MTHFR and colorectal adenoma risk. Mutation Research 2015; 1-6.
28. Sheng W, Qian Y, Wang H, Ma X, Zhang P, Chen L, Ma D, Huang G: Association between mRNA levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MBD2 and LINE-1 methylation status in infants with tetralogy of Fallot. International journal of molecular medicine 2013; 32: 694-702.
29. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012.
30. Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik. Dostop: 02.09.2017
<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>
31. Adamič Š: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 1995.
32. Miller A, Riehle-Colarusso T, Siffel C, Frías L J, Correa A: Maternal Age and Prevalence of Isolated Congenital Heart Defects in an Urban Area of the United States. American Journal of Medical Genetics 2011; 1-9.
33. Gilboa M. S, Correa A, Botto D. L, Rasmussen A. S, Waller K, Hobbs A. C, Cleves A. M, Riehle-Colarusso J. T: Association between prepregnancy body mass index and congenital heart defects. Am J Obstet Gynecol 2010; 202: 51. e1-10.
34. Mills L. J, Troendle J, Conley R. M, Carter T, Druschel M. C: Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. Am J Clin Nutr 2010; 91: 1543-1549.
35. Best K. K, Rankin J: Is Advanced Maternal Age a Risk Factor for Congenital Heart Disease?. Birth Defects Research 2016; 106: 461-467.

36. Shaw M. G, Todoroff K, Schaffer M. D, Selvin S: Maternal height and prepregnancy body mass index as risk factors for selected congenital anomalies. *Paediatrics and Perinatal Epidemiology* 2000; 14: 234-239.
37. Sullivan M. P, Dervan A. L, Reiger S, Buddhé S, Schwartz S. M: Risk of Congenital Heart Defects in the Offspring of Smoking Mothers: A Population-Based Study. *The journal of pediatrics* 2015; 166: 978-984.
38. Deng K, Liu Z, Lin Y, Mu D, Chen X, Li J, Li N, Deng Y, Li X, Wang Y, Li S, Zhu J: Periconceptional Paternal Smoking and the Risk of Congenital Heart Defects: A Case-Control Study. *Birth defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology* 2013; 97: 210-216.
39. Morrow J, Russel A, Guthrie E, Parsons L, Robertson I, Waddell R, Irwin B, McGivern R. C, Morrison P. J, Craig J: Malformation risks of antiepileptic drugs in pregnancy: a prospective study from the UK Epilepsy and Pregnancy Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 193-198.
40. Kek T, Karas Kuželički N, Mlinarič Rašcan I, Geršak K: Characteristics of health behaviours and health status indicators among pregnant women in Slovenia. *Zdrav Vestn.* 2017; 86: 295-317.
41. Tikkanen J, Heinonen O. P: Maternal hyperthermia during pregnancy and cardiovascular malformations in the offspring. *European Journal of Epidemiology* 1991; 7: 628-635.
42. Botto D. L, Mulinare J, Erickson J. D: Do Multivitamin or Folic Acid Supplements Reduce the Risk for Congenital Heart Defects?. *American Journal of Medical Genetics* 2003; 121A: 95-101.
43. Hernandez-Diaz S, Werler M. M, Walker A. M, Mitchell A. A: Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *The New Englan Journal of Medicine* 2000; 343: 1608-1614.
44. Feng Y, Wang S, Chen R, Tong X, Wu Z, Mo X: Maternal Folic Acid Supplementation and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Meta-Analysis of Epidemiological Obseravtional Studies. *Scientific reports* 2015; 1-8.
45. Mohebi-Nejad A, Bikdeli B: Omega-3 Supplements and Cardiovascular Disease. *National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease* 2014; 13 (1): 6-14.

46. Mostowska A, Sajdak S, Pawlik P, Lianeri M, Jagodzinski P. P: DNMT1, DNMT3A and DNMT3B gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 4893-4899.
47. Sun M. Y, Yang X.X, Xu W.W, Yao G. Y, Pan H. Z, Li M: Association of DNMT1 and DNMT3B polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. *Genetics and Molecular Research* 2012; 1-12.
48. Chowdhury S, Cleves M. A, MacLeod S. L, James S. J, Zhao W, Hobbs C. A: Maternal DNA Hypomethylation and Congenital Heart Defects. *Birth Defects Research* 2010; 91: 69-76.
49. Yi F, Zhao L, Hong L, Shan C, Shi W, Cai W: Alteration in methylation pattern of Gata-4 promoter region in vitamin A-deficient offspring's heart. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2012; 1373-1380.

7. PRILOGE

7.1 PRILOGA 1

Primer anketnega vprašalnika, ki so ga izpolnile matere otrok s CHD:

**Analiza bioloških označevalcev presnove folatov pri ugotavljanju
tveganja za
nastanek napak nevralne cevi in prirojenih okvar srca**

Splošni podatki.

Koda preiskovanke:

(izpolni oseba, odgovorna za študijo)

Datum:

Datum
rojstva:

Telesna
višina:

_____ cm

Telesna masa: _____ kg

Status
kajenja:

☐ kadim

☐ nikoli nisem
kadila

☐ nekoč sem kadila

Če ste bivša kadilka, od kdaj ne kadite
več?

Ste prenehali kaditi med nosečnostjo?

_____ *DA*

_____ *NE*

Izobrazba:

- ☐ osnovna šola
- ☐ srednja poklicna šola
- ☐ gimnazija
- ☐ višja šola

- ☐ univerzitetna
izobrazba
- ☐ magisterij ali
doktorat

Tip vzorca:

- ☐ bris bukalne sluznice
- ☐ polna kri, EDTA
- ☐ bris b. sluznice in
polna kri

Datum

odvzema:

Podatki o poteku zdajšnje ali preteklih nosečnosti.

Vaše trenutno stanje:

- ☐ sem noseča
- ☐ dojim
- ☐ ne dojim

Predvideni datum poroda (*izpolnijo le noseče
ženske*):

Število nosečnosti (*pred trenutno nosečnostjo*):

Število živorojenih otrok:

Število splavov (spontanih ali
spodbujenih):

Imam otroka z/s:

- ☐ napako nevralne cevi
- ☐ prirojeno srčno napako
- ☐ orofacialno shizo
- ☐ drugo prirojeno napako
- ☐ otrok nima klinično potrjene prirojene
napake

Diagnoza (šifra):

Operativna korekcija:

DA

NE

Vzorec otroka:

- ☐ bris bukalne sluznice
- ☐ polna kri, EDTA
- ☐ bris b. sluznice in polna kri
- ☐ nimamo vzorca

Datum odvzema:

Ali se je v vaši družini že rodil otrok z
eno izmed prirojenih motenj?

DA

NE

Če da, katero?

- ☐ napako nevralne cevi
- ☐ prirojeno srčno napako
- ☐ orofacialno shizo
- ☐ drugo prirojeno napako

Vaše sorodstveno razmerje s tem
otrokom

(le, če ste na prejšnje vprašanje odgovorili z DA):

- ☐ mati
- ☐ sestra
- ☐ teta
- ☐ sestrična
- ☐ babica

**Podatki o stanju nosečnosti, v kateri ste rodili otroka z okvaro nevralne cevi /
prirojeno srčno okvaro / orofacialno shizo.**

Datum rojstva otroka:

Vaša telesna masa pred zanositvijo:

_____ kg

Spol otroka:

M

Ž

Sladkorna bolezen pred nosečnostjo: DA NE

Nosečniška sladkorna bolezen: DA NE

Ali imate katero drugo kronično bolezen? DA NE

Če da, katero/-e:

Ali ste med nosečnostjo jemali zdravila za zdravljenje epilepsije? DA NE

Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila? DA NE

Če da, katera:

Ali ste imeli v prvem trimestru nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38 °C? DA NE

Ali ste v prvem trimestru zahajali v savno? DA NE

Ali ste pred zanositvijo jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere:

Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere:

Kdaj ste začeli jemati folno kislino?

- ☐ pred zanositvijo
- ☐ pred izostankom menstruacije
- ☐ takoj po izostanku menstruacije

- ☐ več kot 1 teden po izostanku menstruacije

Ali ste folno kislino jemali redno vsak dan?

- ☐ DA
☐ NE, občasno sem pozabila vzeti tableto
☐ NE, po tabletah mi je slabo
☐ NE, ni se mi zdelo potrebno

Ali ste poleg pripravkov s folno kislino pred in/ali med nosečnostjo jemali še katere druge (multi)vitaminske pripravke?

DA

NE

Če da, katere:

Kako podobna sedanji prehrani je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred to zanositvijo? (0–se ne spominjam; 1–popolnoma drugačna, 5–praktično enaka)

0 1 2 3 4 5

Podatki o stanju med zadnjo neprizadeto nosečnostjo.

Datum rojstva otroka:

Vaša telesna masa pred zanositvijo:

_____ kg

Spol otroka:

M

Ž

Sladkorna bolezen pred nosečnostjo:

DA

NE

Nosečniška sladkorna bolezen:

DA

NE

Ali imate katero drugo kronično bolezen? DA NE

Če da, katero/-e:

Ali ste med nosečnostjo jemali zdravila za zdravljenje epilepsije? DA NE

Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila? DA NE

Če da, katera:

Ali ste imeli v prvem trimestru nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38 °C? DA NE

Ali ste v prvem trimestru zahajali v savno? DA NE

Ali ste pred zanositvijo jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere:

Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere:

Kdaj ste začeli jemati folno kislino?

- ☐ pred izostankom menstruacije
- ☐ takoj po izostanku menstruacije
- ☐ več kot 1 teden po izostanku menstruacije

Ali ste folno kislino jemali redno vsak dan?

- ☐ DA
- ☐ NE, občasno sem pozabila vzeti tableto
- ☐ NE, po tabletah mi je slabo
- ☐ NE, ni se mi zdelo potrebno

Ali ste poleg pripravkov s folno kislino pred in/ali med nosečnostjo jemali še katere druge (multi)vitaminske pripravke?

DA

NE

Če da, katere:

Kako podobna sedanji prehrani je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo? (0–se ne spominjam; 1–popolnoma drugačna, 5–praktično enaka)

0 1 2 3 4 5

Prehrana v zadnjih 4 tednih.

V spodnji tabeli označite, kako pogosto ste v zadnjih 4 tednih uživali naslednja živila. Ovrednotite pogostost po naslednji lestvici:

0 nikoli

5 1-krat dnevno

1 1–3-krat na mesec

6 2–3-krat na dan

2 1-krat tedensko

7 4–5-krat na dan

3 2–4-krat na teden

8 več kot 6-krat na dan

4 5–6-krat na teden

Živilo

Pogostost uživanja v zadnjih 4 tednih

mleko in mlečni izdelki	0	1	2	3	4	5	6	7	8
mleko									
jogurt									
sir									
parmezan									
sadje in sadni sokovi	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pomarančni sok									
sok grenivke									
pomaranče									
grenivke									
banane									

ananas									
melone									
jagode									
maline									
zelenjava	0	1	2	3	4	5	6	7	8
paradižnikov sok									
paradižnikova omaka									
svež paradižnik									
rdeča pesa									
brokoli									
špinača									
koleraba									
zelena solata									
šparglji									
redkvice									
brstični ohrovt									
kitajsko zelje									
Žitarice, stročnice, semena in oreški	0	1	2	3	4	5	6	7	8
fižol									
riž									
koruza									
grah									
leča									
sezam (semena, olje, omaka tahini)									
brazilski oreški									
soja (napitek, kosmiči, omaka, tofu)									

pšenični kalčki									
oves (kosmiči, piškoti)									
arašidi									
čičerika									
mandlji									
indijski oreški									
sončnična semena									
bučna semena									
kruh (vseh vrst)									
polnozrnat testenine									
meso	0	1	2	3	4	5	6	7	8
ribe									
tuna									
piščanec									
puran									
svinjina									
slanina									
govedina									
jetra									
školjke									
ostalo	0	1	2	3	4	5	6	7	8
jajca (cela)									
samo rumenjak									
samo beljak									
pivo									
prehranska dopolnila	0	1	2	3	4	5	6	7	8

multivitaminska PD										
pripravki s folno kislino										
pripravki z vitamini B kompleksa										

7.2 PRILOGA 2

Primer anketnega vprašalnika, ki so ga izpolnile matere zdravih otrok:

**Analiza bioloških označevalcev presnove folatov pri ugotavljanju
tveganja za
nastanek napak nevralne cevi in prirojenih okvar srca**

Splošni podatki.

Koda preiskovanke:

(izpolni oseba, odgovorna za študijo)

Datum:

Datum
rojstva:

Telesna
višina:

_____ cm

Telesna masa: _____ kg

Status
kajenja:

☐ kadim

☐ nikoli nisem
kadila

☐ nekoč sem kadila

Če ste bivša kadilka, od kdaj ne kadite
več?

Ste prenehali kaditi med nosečnostjo?

_____ *DA*

_____ *NE*

Izobrazba: ☐ osnovna šola
☐ srednja poklicna šola
☐ gimnazija
☐ višja šola
☐ univerzitetna
izobrazba
☐ magisterij ali
doktorat

Tip vzorca: ☐ bris bukalne sluznice
☐ polna kri, EDTA
☐ bris b. sluznice in
polna kri

Datum
odvzema:

Podatki o poteku zdajšnje ali preteklih nosečnosti.

Vaše trenutno stanje: ☐ sem noseča
☐ dojim
☐ ne dojim

Predvideni datum poroda (*izpolnijo le noseče
ženske*):

Število nosečnosti (*pred trenutno nosečnostjo*):

Število živorojenih otrok:

Število splavov (spontanih ali
spodbujenih):

Ali se je v vaši družini že rodil otrok z
eno izmed prirojenih motenj?

DA

NE

Vaše sorodstveno razmerje s tem otrokom

(le, če ste na prejšnje vprašanje odgovorili z DA):

- ☐ mati
- ☐ sestra
- ☐ teta
- ☐ sestrična
- ☐ babica

Podatki o stanju med zadnjo nosečnostjo.

Datum rojstva otroka:

Vaša telesna masa pred zanositvijo:

_____ kg

Spol otroka:

M

Ž

Sladkorna bolezen pred nosečnostjo:

DA

NE

Nesečniška sladkorna bolezen:

DA

NE

Ali imate katero drugo kronično bolezen?

DA

NE

Če da, katero/-e:

Ali ste med nosečnostjo jemali zdravila za zdravljenje epilepsije?

DA

NE

Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila?

DA

NE

Če da, katera:

Ali ste imeli v prvem trimestru nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38 °C?

DA

NE

Ali ste imeli v prvem trimestru zahajali v savno? DA NE

Ali ste pred zanositvijo jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere:

Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere:

Kdaj ste začeli jemati folno kislino?

- ☐ pred zanositvijo
- ☐ pred izostankom menstruacije
- ☐ takoj po izostanku menstruacije
- ☐ več kot 1 teden po izostanku menstruacije

Ali ste folno kislino jemali redno vsak dan?

- ☐ DA
- ☐ NE, občasno sem pozabila vzeti tableto
- ☐ NE, po tabletah mi je slabo
- ☐ NE, ni se mi zdelo potrebno

Ali ste poleg pripravkov s folno kislino pred in/ali med nosečnostjo jemali še katere druge (multi)vitaminske pripravke? DA NE

Če da, katere:

Ali ste kdaj prekinili nosečnost zaradi okvare ploda? DA NE

Če da, vpišite katero:

Kako podobna sedanji prehrani je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo? (0–se ne spominjam; 1–popolnoma drugačna, 0 1 2 3 4 5

5–praktično enaka)

Prehrana v zadnjih 4 tednih.

V spodnji tabeli označite, kako pogosto ste v zadnjih 4 tednih uživali naslednja živila. Ovrednotite pogostost po naslednji lestvici:

- | | |
|---------------------|-------------------------|
| 0 nikoli | 5 1-krat dnevno |
| 1 1–3-krat na mesec | 6 2–3-krat na dan |
| 2 1-krat tedensko | 7 4–5-krat na dan |
| 3 2–4-krat na teden | 8 več kot 6-krat na dan |
| 4 5–6-krat na teden | |

Živilo	Pogostost uživanja v zadnjih 4 tednih								
mleko in mlečni izdelki	0	1	2	3	4	5	6	7	8
mleko									
jogurt									
sir									
parmezan									
sadje in sadni sokovi	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pomarančni sok									
sok grenivke									
pomaranče									
grenivke									
banane									
ananas									
melone									
jagode									
maline									
zelenjava	0	1	2	3	4	5	6	7	8

paradižnikov sok									
paradižnikova omaka									
svež paradižnik									
rdeča pesa									
brokoli									
špinača									
koleraba									
zelena solata									
šparglji									
redkvice									
brstični ohrovt									
kitajsko zelje									
žitarice, stročnice, semena in oreški	0	1	2	3	4	5	6	7	8
fižol									
riž									
koruza									
grah									
leča									
sezam (semena, olje, omaka tahini)									
brazilski oreški									
soja (napitek, kosmiči, omaka, tofu)									
pšenični kalčki									
oves (kosmiči, piškoti)									
arašidi									
čičerika									
mandlji									

indijski oreški									
sončnična semena									
bučna semena									
kruh (vseh vrst)									
polnozrnat testenine									
meso	0	1	2	3	4	5	6	7	8
ribe									
tuna									
piščanec									
puran									
svinjina									
slanina									
govedina									
jetra									
školjke									
ostalo	0	1	2	3	4	5	6	7	8
jajca (cela)									
samo rumenjak									
samo beljak									
pivo									
prehranska dopolnila	0	1	2	3	4	5	6	7	8
multivitaminska PD									
pripravki s folno kislino									
pripravki z vitamini B kompleksa									

7.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Št. Vzorca	BHMT	GNMT	DNMT3B
SRC_001_M	GG	TT	CC
SRC_001_C	GG	TT	CC
SRC_002_M	AG	CC	CT
SRC_002_C	AG	CC	CC
SRC_003_M	GG	TT	CC
SRC_003_C	AG	CT	CT
SRC_004_M	GG	CT	CC
SRC_004_C	GG	TT	CT
SRC_005_M	AG	CT	CT
SRC_005_C	GG	CT	CT
SRC_006_M	GG	CT	CT
SRC_006_C	AG	TT	CT
SRC_007_M	GG	CC	CT
SRC_007_C	GG	CT	TT
SRC_008_M	AG	CT	CC
SRC_008_C	AG	TT	CC
SEC_009_M	AG	CC	CC
SRC_009_C	GG	CT	CC
SRC_010_M	AG	CC	TT
SRC_010_C	AA	CC	TT
SRC_011_M	GG	CT	TT
SRC_011_C	AG	CC	CT
SRC_012_M	GG	CT	CC
SRC_012_C	GG	CC	CT
SRC_013_M	AG	CT	CT
SRC_013_C	GG	CC	CT
SRC_014_M	GG	CT	CC
SRC_014_C	GG	CT	CC
SRC_015_M	GG	TT	TT
SRC_015_C	AG	TT	CT
SRC_016_M	AG	TT	CT
SRC_016_C	AG	TT	CC
SRC_017_M	AG	CT	CC
SRC_017_C	GG	CC	CT
SRC_018_M	AG	CT	CC
SRC_018_C	AA	CC	CC
SRC_019_M	GG	TT	CC
SRC_019_C	AG	TT	CC
SRC_020_M	GG	CT	CC
SRC_020_C	GG	CT	CC

LEGENDA:

BHMT: 0 - divji tip GG
 1 - mutiran AA
 2 - heterozigot AG

GNMT: 0 - divji tip CC
 1 - mutiran TT
 2 - heterozigot CT

DNMT3B: 0 - divji tip CC
 1 - mutiran TT
 2 - heterozigot CT

SRC_021_M	AG	TT	TT
SRC_021_C	AG	CT	TT
SRC_022_M	AG	TT	CC
SRC_022_C			CT
SRC_023_M	AG	CC	CC
SRC_023_C	GG	CT	CT
SRC_024_M	GG	TT	CT
SRC_024_C	GG	TT	TT
SRC_026_M		CT	
SRC_026_C	AA	CC	
SRC_027_M	GG	CC	CT
SRC_027_C	GG	CC	CC
SRC_028_M	GG	TT	CT
SRC_028_C	GG	CT	CT
SRC_029_M	GG	CC	CC
SRC_029_C	GG	CT	CT
SRC_030_M	AA	CT	CT
SRC_030_C	AA	CT	TT
SRC_032_M	AA	CC	CT
SRC_032_C	AA	CT	CT
SRC_033_M	AG	CT	TT
SRC_033_C	AG	CT	TT
SRC_034_M	GG	CT	CT
SRC_034_C	GG	CT	TT
SRC_035_M	GG	CT	CC
SRC_035_C	GG	CT	CC
SRC_036_M	GG	CT	CT
SRC_036_C	GG	TT	TT
SRC_037_M	AA	CT	CT
SRC_037_C	AG	CT	CT
SRC_038_M	AG	CT	TT
SRC_038_C	GG	CC	CT
SRC_039_M	AG	CT	TT
SRC_039_C	GG	CC	TT
SRC_040_M	AG	CC	CT
SRC_040_C	GG	CT	TT
SRC_041_M	GG	TT	CT
SRC_041_C	GG	CT	TT
SRC_042_M	AG	TT	CT
SRC_042_C	AG	CT	CT
SRC_043_M	GG	CC	TT
SRC_043_C	GG	CC	CT
SRC_044_M	GG	CT	CT
SRC_044_C	GG	TT	CT

SRC_045_M	AG	TT	CC
SRC_045_C	AA	CT	CT
SRC_046_M	AG	CT	TT
SRC_046_C	AG	CT	TT
SRC_047_M	GG	CT	TT
SRC_047_C	AG	TT	CT
SRC_048_M	GG	CT	CT
SRC_048_C	GG	CT	CC
SRC_049_M	AA	CT	CT
SRC_049_C	AG	CT	CT
SRC_050_M	GG	CC	CT
SRC_050_C	GG	CT	TT
SRC_051_M	GG	TT	CT
SRC_051_C	GG	TT	CT
SRC_052_M	AG	TT	TT
SRC_052_C	AG	TT	TT
SRC_053_M	GG	CT	CC
SRC_053_C	AG	CC	CC
SRC_054_C	GG	CT	CT
SRC_055_M	GG	TT	CC
SRC_055_C	GG	CT	CC
SRC_056_M	AG	CT	CT
SRC_056_C	GG	TT	CT
SRC_057_M	AG	CT	CT
SRC_057_C	AG	CT	TT
SRC_058_M	AG	CC	CC
SRC_058_C	GG	CC	CC
SRC_059_M	AG	CC	CC
SRC_059_C	AG	CC	CC
SRC_060_M	AG	TT	CT
SRC_060_C	GG	CT	CT
SRC_061_M	AG	CT	CC
SRC_061_C	AG		CC
SRC_062_M	AG	CC	CT
SRC_062_C	AA	CC	CT
SRC_063_M	GG	TT	CC
SRC_063_C	GG	CT	CT
SRC_064_M	AG	TT	CT
SRC_064_C	GG	TT	CC
SRC_065_M	AG	CT	CT
SRC_065_C	AG	CT	CT
SRC_066_M	AG	CT	CT
SRC_066_C	GG	CT	CC
SRC_067_M	GG	CC	CT

SRC_067_C	AG	CT	CC
SRC_068_M	AG	CT	CT
SRC_068_C1	AG	CT	CT
SRC_068_C2	AG	CT	CT
SRC_069_M	AG	TT	CT
SRC_069_C	GG	TT	CT
SRC_070_M	AG	CC	CC
SRC_070_C	AG	CC	CC
SRC_071_M	AG	CC	CT
SRC_071_C	GG	CC	TT
SRC_072_M	AG	CT	CC
SRC_072_C	AA	CC	CC
SRC_073_M	AG	TT	CC
SRC_073_C	AG	CT	CT
SRC_074_M	GG	TT	TT
SRC_074_C	GG	TT	CT
SRC_075_M	GG	TT	CC
SRC_075_C	GG	CT	CT
SRC_076_M	AG	TT	CC
SRC_076_C	AG	TT	CT
SRC_077_M	GG	TT	CT
SRC_077_C	AG	TT	CC
SRC_078_M	AG	CC	CT
SRC_078_C	GG	CC	CT
SRC_079_M	AG	CT	CC
SRC_079_C	AG	TT	CC
SRC_080_M	AG	CT	CT
SRC_080_C	AG	CT	CC
SRC_081_M	AG	CC	TT
SRC_081_C	AG		CT
SRC_082_M	AG	TT	CT
SRC_082_C	AG		CT
SRC_083_M	GG	CC	CT
SRC_083_C	GG	CT	TT
SRC_084_M	GG	CT	CC
SRC_084_C			
SRC_085_M	AG	CT	CC
SRC_085_C	AG	CT	CT
SRC_086_M	AG	CT	CT
SRC_086_C	GG	CT	CT
SRC_087_M	AG	CC	CT
SRC_087_C	GG	CC	CC
SRC_088_M	AG	CT	CC
SRC_088_C	AG	CT	CT

SRC_089_M	AG	CT	CT
SRC_089_C	AG	CT	CC
SRC_090_M	AG	TT	TT
SRC_090_C	AG	TT	CT
SRC_091_M	AG	CT	CC
SRC_091_C	AG	CC	CC
SRC_092_M	GG	CT	CT
SRC_092_C	GG	CT	CT
SRC_093_M	GG	TT	CT
SRC_093_C	GG	CT	CC
SRC_094_M	AG	TT	CC
SRC_094_C	AA	CT	CT
SRC_095_M	AA	CC	CT
SRC_095_C	AG	CC	TT
SRC_096_M	AG	CC	CT
SRC_096_C	AG	CC	CT
SRC_097_M	GG	CC	CT
SRC_097_C	AG	CT	CC
SRC_098_M	GG	CT	TT
SRC_098_C	AG	CC	CT
SRC_099_M	AG	CC	CT
SRC_099_C	AA	CC	CT
SRC_100_M	AA	CC	CT
SRC_100_C	AA	CT	CC
SRC_101_M	GG	CT	TT
SRC_101_C	GG	CT	TT
SRC_102_M	AG	CT	CT
SRC_102_C	AA	CT	CT
SRC_103_M	AA	TT	CT
SRC_103_C	AG	CT	TT
SRC_104_M	AG	CT	CC
SRC_104_C	AA	CT	CC
SRC_105_M	AA	CT	CC
SRC_105_C	AA	CT	CC
SRC_106_M	AG	CT	CC
SRC_106_C	AA	CT	CC
SRC_107_M	GG	TT	CT
SRC_107_C	GG	CT	TT
SRC_108_M	GG	TT	CT
SRC_108_C	GG	TT	CC
SRC_109_M	GG	CT	CT
SRC_109_C	AG	CT	CC
SRC_110_M	AG	CT	TT
SRC_110_C	GG	CC	CT

SRC_111_M	GG	CT	CT
SRC_111_C	AG	CC	CC
SRC_112_M	AG	CC	TT
SRC_112_C	AG	CT	CT
SRC_113_M	GG	CC	TT
SRC_113_C	AG	CT	CT
SRC_114_M	GG	CT	CT
SRC_114_C	AG	CT	TT
SRC_115_M	AG	TT	CT
SRC_115_C	GG	CT	CT
SRC_116_M	AG	CT	CC
SRC_116_C	GG	CT	CT
SRC_117_M	AG	CT	TT
SRC_117_C	AG	CC	CT
SRC_118_M	AG	CC	TT
SRC_118_C	GG	CC	CT
SRC_119_M	AG	TT	CT
SRC_119_C	AG	CT	TT
SRC_120_M	GG	TT	CT
SRC_120_C	GG	TT	CC
SRC_121_M	GG	CC	TT
SRC_121_C	GG	CT	TT
SRC_122_M	AA	CT	TT
SRC_122_C	AG	CT	CT
SRC_123_M	AG	CT	CC
SRC_123_C	GG	TT	CC
SRC_124_M	AG	CC	CT
SRC_124_C	AA	CT	CC
SRC_125_M	GG	CC	CC
SRC_125_C	AG	CT	CC
SRC_126_M	AG	CT	CT
SRC_126_C	AG	CT	CT
SRC_127_M	AG	CT	CT
SRC_127_C	AA	CT	CC
SRC_128_M	GG	CT	CT
SRC_128_C	AG	CT	CT
SRC_129_M	GG	CT	TT
SRC_129_C	GG	CT	TT
SRC_130_M	GG	CT	CT
SRC_130_C	AG	CT	CC
SRC_131_M	GG	CC	CT
SRC_131_C	AG	CC	CT
SRC_132_M	GG	CC	CC
SRC_132_C	AG	CC	CC

SRC_133_M	GG	TT	CC
SRC_133_C	AG	TT	CC
SRC_134_M	AG	CC	CT
SRC_134_C	AG	CC	CC
SRC_135_M	GG	CT	CT
SRC_135_C	AG	CT	CT
SRC_136_M	GG	CT	CC
SRC_136_C	GG	CT	CC
SRC_137_M	GG	CC	CC
SRC_137_C	GG	CC	CT
SRC_138_M	AG	CC	CT
SRC_138_C	AA	CC	TT
SRC_139_M	AG	CC	CC
SRC_139_C	GG	CT	CT
SRC_140_M	GG	CT	CT
SRC_140_C	GG	TT	CT
SRC_141_M	AG	CT	CT
SRC_141_C	AA	CC	CT
SRC_142_M	GG	TT	CT
SRC_142_C	AG	CT	CC
SRC_143_M	GG	CT	CC
SRC_143_C	GG	CT	CC
SRC_144_M	AA	CC	CT
SRC_144_C	AG	CT	CC
SRC_145_M	AG	TT	CC
SRC_145_C	AG	TT	CC
SRC_146_M	GG	CC	CC
SRC_146_C	AG	CT	CT
SRC_147_M	GG	CT	CC
SRC_147_C	GG	CT	CC
SRC_148_M	GG	CT	TT
SRC_148_C	GG	TT	CT
SRC_149_M	AA	TT	CC
SRC_149_C	AG	TT	CT
SRC_150_M	GG	TT	CT
SRC_150_C	GG	TT	CT