

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IDA LESAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IDA LESAR

**VPLIV POLIMORFIZMOV V GENIH ZA ENCIME FOLATNEGA
CIKLA NA POJAVNOST PRIROJENIH SRČNIH NAPAK V
SLOVENSKI POPULACIJI**

**THE INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN FOLATE METABOLISM
GENES ON THE OCCURRENCE OF CONGENITAL HEART DISEASE
IN THE SLOVENIAN POPULATION**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

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

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici doc. dr. Nataši Karas Kuželički in somentorici asist. dr. Alenki Šmid za vso potrpežljivost, podporo, vodenje, strokovno pomoč in svetovanje pri izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala pa gre tudi družini in Adnanu za vso podporo in potrpljenje med študijem, za vse spodbudne besede in ker so vedno verjeli vame tudi, ko sama nisem.

Ida Lesar

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.

Ida Lesar

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 Srce	1
1.1.1 Zgradba srca	1
1.1.2 Razvoj srca	2
1.1.3 Prirojene srčne napake	2
1.1.4 Najpogostejše prirojene srčne napake	4
1.2 Folati	5
1.2.1 Absorpcija in presnova folatov	6
1.2.2 Polimorfizmi v genih za encime, ki sodelujejo pri presnovi folatov	9
1.2.3 MTHFR rs1801133 C>T, rs1801131 A>C	9
1.2.4 MTRR rs1801394 A>G	12
1.2.5 MTHFD1 rs2236225 G>A	13
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Preiskovanci in potek študije	17
3.2 Izolacija DNA	17
3.2.1 Reagenti	18
3.2.2 Instrumenti in oprema	18

3.3	Genotipizacija	18
3.3.1	Reagenti	20
3.3.2	Instrumenti in oprema.....	20
3.3.3	Potek dela	20
3.4	Statistična analiza	22
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1	Analiza anketnega vprašalnika	24
4.1.1	Opisna statistika spremenljivk.....	24
4.1.2	Analiza kategoričnih spremenljivk.....	33
4.2	Analiza rezultatov genotipizacije.....	41
4.2.1	MTHFR rs1801133, rs1801131.....	43
4.2.2	MTRR rs1801394.....	44
4.2.3	MTHFD1 rs2236225	45
4.2.4	Analiza kombinacij tveganih genotipov	45
4.3	Vrednotenje vpliva genotipov in drugih okoljskih dejavnikov na pojavnost prirojene srčne napake v modelih logistične regresije.....	48
4.4	Analiza parov mati-otrok, kjer matere v nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov.....	54
5	SKLEPI	56
6	LITERATURA	58
7	PRILOGE	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba srca in prikaz normalnega pretoka krvi (2)	1
Slika 2: Shematski prikaz reakcij poliglutamacije in hidrolize (12). FPGS: folilpoliglutamat sintaza; GGH: γ glutamil hidrolaza.	7
Slika 3: Shematski prikaz povezanosti cikla presnove folatov s presnovo vitamina B12, remetilacijskim ciklom in presnovo homocisteina (11).	8
Slika 4: Slikovni prikaz genotipiziranja s hidrolizirajočimi sondami (42).....	19
Slika 5: Primer grafa genotipizacije v končni točki za gen MTHFD1	22
Slika 6: Kvantilni prikaz števila nosečnosti v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa.....	26
Slika 7: Kvantilni prikaz števila živorojenih otrok v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa.....	27
Slika 8: Kvantilni prikaz starosti matere ob vzorčenju v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa.....	27
Slika 9: Kvantilni prikaz starosti mater ob zanositvi v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa.....	28
Slika 10: Kvantilni prikaz telesne višine mater v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa.....	29
Slika 11: Kvantilni prikaz telesne mase matere ob zanositvi v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa.....	30
Slika 12: Kvantilni prikaz indeksa telesne mase matere ob zanositvi v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa	30
Slika 13: Kvantilni prikaz števila spontanih splavov oz. prekinitev nosečnosti v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa	31
Slika 14: Kvantilni prikaz povprečnih količin Metionina na mesec v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa	32
Slika 15: Kvantilni prikaz povprečnih količin folne kisline na mesec v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa	33
Slika 16: Kvantilni prikaz števila mutiranih alelov na 4 preiskovanih lokusih v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa	46
Slika 17: Grafični prikaz kombinacij genotipov MTRR in MTHFD1 pri otrocih ter rezultat Chi-kvadrat testa.....	47

Slika 18: Grafični prikaz kombinacij genotipov MTHFR in MTHFD1 pri otrocih ter rezultat Chi-kvadrat testa..... 48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Kratek opis in delež najpogostejših prirojenih srčnih napak (7,8)	4
Preglednica II: Reakcijska mešanica za eno PCR reakcijo	21
Preglednica III: Nastavitve programa v Lightcycler 480	21
Preglednica IV: Opisna statistika parametričnih spremenljivk in rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa za normalnost porazdelitve	25
Preglednica V: Rezultati Chi-kvadrat testa. Primerjava frekvenc kategoričnih spremenljivk med kontrolno in testno skupino.....	34
Preglednica VI: Rezultati genotipizacije - Chi-kvadrat test	42
Preglednica VII: Prikaz končnega modela logistične regresije 1–matere	50
Preglednica VIII: Prikaz končnega modela logistične regresije 2–matere.....	51
Preglednica IX: Prikaz končnega modela logistične regresije 3–otroci	52
Preglednica X: Prikaz končnega modela logistične regresije 4–otroci.....	53
Preglednica XI: Frekvence genotipov mater in otrok za encime MTHFD1, MTRR in MTHFR v subpopulaciji mater, ki med nosečnostjo niso uživale folatnih pripravkov v kontrolni in testni skupini.	55

POVZETEK

Srce je mišični organ življenjskega pomena, njegova glavna naloga je, da telo preskrbuje s kisikom in hranilnimi snovmi. Srčno-žilni sistem se začne razvijati že v 3. tednu nosečnosti in je prvi najpomembnejši delujoči sistem v telesu. Posledica nepravilnega in nepopolnega razvoja srca ploda so prirojene srčne napake. Vzrok za njihov nastanek je nejasen, lahko so posledica genetskih sprememb, kromosomskih nepravilnosti ali vplivov iz okolja. Za normalen razvoj ploda so ključnega pomena folati, pomembni so v remetilacijskem ciklu metionina in imajo vpliv na metilacijo DNA in razpoložljivost nukleotidov za sintezo ter popravilo DNA. Z nezadostnim vnosom folatov in polimorfizmi posameznih nukleotidov v genih, katerih produkti sodelujejo v presnovi folatov, povezujejo nastanek prirojenih napak ploda, med drugimi tudi prirojene srčne napake. Polimorfizmi posameznih nukleotidov lahko vplivajo na funkcijo proteinov, presnovo folatov ter motijo plodov normalni razvoj. Pod drobnogled smo v magistrski nalogi vzeli encime v presnovi folatov, in sicer metilentetrahidrofolat dehidrogenazo (MTHFR), metilentetrahidrofolat reduktazo (MTHFD1) in metionin sintaze reduktazo (MTRR). Iz brisa bukalne sluznice smo izolirali DNA in z metodo PCR v realnem času določili genotipe encimov, ki sodelujejo v presnovi folatov, zdravih otrok in otrok s prirojeno srčno napako ter njihovih mater. V kontrolni skupini je sodelovalo 199 parov mater in otrok, v testni skupini pa 150. Analizirali smo tudi druge okoljske dejavnike, ki bi lahko imeli vpliv na pojav prirojenih srčnih napak. Ugotovili smo, da pozitivna družinska anamneza poveča verjetnost za nastanek prirojenih srčnih napak. Prav tako na tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak vplivata status kajenja matere in jemanje drugih prehranskih dopolnil in pripravkov s folati v času nosečnosti. Matere kadilke in matere, ki so med nosečnostjo jemale mineralne (Ca, Mg), imajo večjo verjetnost za rojstvo otroka s prirojeno srčno napako. Nismo ugotovili statistično značilne razlike v frekvencah genotipov encimov MTHFR in MTRR med kontrolno in testno skupino. Mutiran genotip MTHFD1 deluje zaščitno pred pojavom prirojenih srčnih napak, prav tako protektivno delujejo kombinacije mutiranih genotipov MTHFD1 in MTRR ter MTHFD1 in MTHFR.

KLJUČNE BESEDE:

Prirojene srčne napake, polimorfizmi, genotipizacija, MTHFR, MTHFD1, MTRR.

ABSTRACT

The heart is a muscular organ, which supplies body with oxygen and nutrients. The cardiovascular system already begins to develop in the third week of gestation and is the first active major system in the body. Congenital heart defects occur due to improper development of the heart. The cause of congenital heart defect is unclear; it may be result of genetic modification, chromosomal abnormalities or environmental influences. Because of their role in the remethylation cycle of methionine, impact on the methylation of DNA, availability of nucleotides for the synthesis and repair of DNA, the folates are important for the normal development of the fetus. Inadequate intake of folate or single nucleotide polymorphisms can result into congenital heart defect. Single nucleotide polymorphisms can influence the function of the protein, disrupt folate metabolism and affect the development of fetus. The aim of this thesis is to investigate and analyze the influence of polymorphisms in folate metabolism genes; Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), Methionine synthase reductase (MTRR) and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1). The DNA was isolated from buccal mucosa and with PCR in real time determined genotypes of enzyme in folate metabolism of healthy children and children with congenital heart defects and their mothers. Environmental factors that could have an impact on the occurrence of congenital heart defects were also analyzed. The thesis shows, that medical history, smoking and taking supplements and other products that contain folate during pregnancy affects the risk of developing congenital heart defects. Statistically significant differences in frequencies of genotypes of the MTHFR and MTRR between the control group and test group were not found. The combinations of mutant genotypes MTHFD1 and MTRR, MTHFD1 and MTHFR turned out to work protective.

KEY WORDS:

Congenital heart defects, polymorphisms, genotyping, MTHFR, MTHFD1, MTRR.

SEZNAM OKRAJŠAV

μL	mikroliter	mL	mililiter
BHMT	betain:homocistein metiltransferaza	MTHFD1	metilentetrahidrofolat dehidrogenaza
CBS	cistationin β sintaza	MTHFR	metilentetrahidrofolat reduktaza
cm	centimeter	MTR	metionin sintaza
CTH	cistationin γ liaza	MTRR	metionin sintaze reduktaza
DHF	dihidrofolat	ng	nanogram
DHFR	dihidrofolat reduktaza	PCFT1	s protoni sklopljen folatni receptor
DNA	deoksiribonukleinska kislina	RFC1	prenašalec reduciranih folatov
dTMP	deoksitimidin monofosfat	SAH	S-adenozil homocistein
dUMP	deoksiuridilat monofosfat	SAHH	S-adenozil homocistein hidrolaza
EtOH	etanol	SAM	S-adenozil metionin
FPGS	folilpoliglutamat sintaza	SHMT	serin hidroksimetiltransferaza
g	gram	SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
GGH	γ glutamil hidrolaza	THF	tetrahidrofolat
kg	kilogram	TYMS	timidilat sintaza
KS	kontrolna skupina	TS	testna skupina
MAT	metionin adenoziltransferaza	UNG	uracil-N-glikozilaza

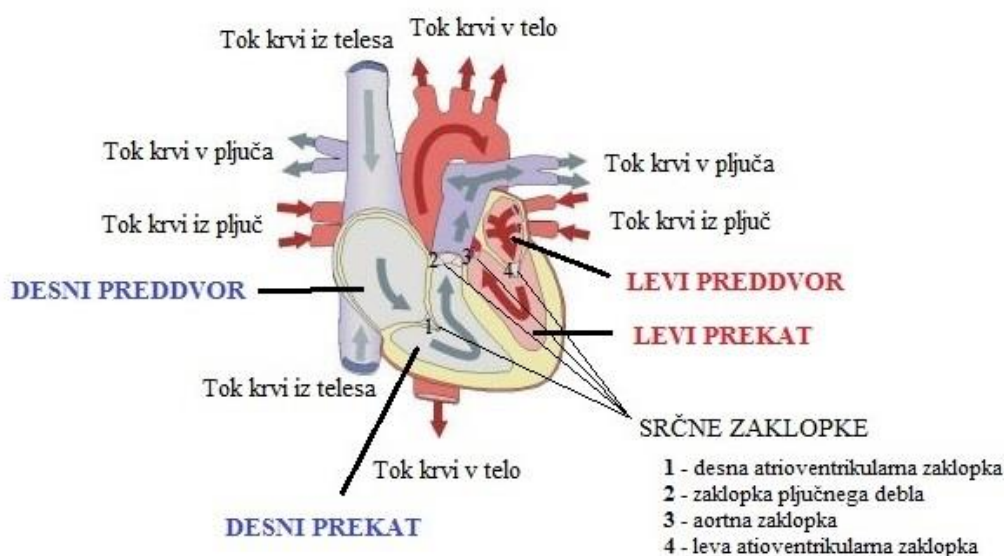
1 UVOD

1.1 SRCE

Srce je votel mišični organ, ki leži znotraj osrčnika v prsnem košu. Je življenjskega pomena, saj je njegova glavna naloga, da po žilah poganja kri in tako telo preskrbuje s kisikom in hranilnimi snovmi, prav tako pa odstranjuje iz telesa kri, revno s kisikom (1,2).

1.1.1 ZGRADBA SRCA

Srčni pretin ali vzdolžna mišična pregrada deli srce na levo in desno polovico, vsako polovico pa sestavljata preddvor (atrij) in prekat (ventrikel). Srce deluje kot črpalka in omogoča, da se kri pretaka po žilah. Po arterijah teče kri iz srca, kri, ki se vrača v srce, pa teče po venah. Desni del srca poganja deoksigenirano kri v pljuča, tam se kri obogati s kisikom in vstopi v levi del srca. Levi del srca nato poganja oksigenirano kri v telo in ga tako preskrbi s kisikom. Enosmerni tok krvi v srcu omogočajo štiri zaklopke, ki jih najdemo na vstopišču in izstopišču iz prekatov. Vračanje krvi nazaj iz prekata v preddvor preprečuje atrioventrikularna zaklopka, ki se nahaja med obema preddvoroma in prekatoma, tako na levi kot na desni strani srca. Aortna zaklopka in zaklopka pljučnega debla sta arterijski zaklopki in preprečujeta vračanje krvi iz arterij v prekata. Pljučna zaklopka torej omogoči pretok krvi iz desnega prekata v pljuča, aortna zaklopka pa pretok krvi iz levega prekata v aorto in nato dalje po telesu (3,4).



Slika 1: Zgradba srca in prikaz normalnega pretoka krvi (2)

1.1.2 RAZVOJ SRCA

Obtočila oziroma srčno-žilni sistem se začne razvijati v tretjem tednu nosečnosti in je prvi najpomembnejši delujoči sistem v telesu. Razvijati se začne, ker zarodek zgolj z difuzijo ne more zadovoljiti svojih potreb po kisiku in hranilnih snoveh. Osnova za nastanek srca je združitvev dveh vzdolžnih cevk v eno srčno cev, ki se postopoma začne daljšati in nato zvijati v obliki črke S. V četrtem tednu nosečnosti je srčna cev sestavljena iz štirih odsekov, to so primitivni preddvor, primitivni prekat, venski sinus in srčni bulbus. Kasneje se del srčnega bulbusa vključi v desni prekat, obenem nastanejo tudi iztočne poti iz obeh prekatov, del srčnega bulbusa pa postane proksimalni del aorte in pljučne arterije. Sredi četrtega tedna se začne delitev preddvora in prekata, ki se konča na koncu petega tedna razvoja. Prvi pretin nastane v skupnem preddvoru in raste proti prekatom, temu sledi nastanek drugega pretina. V petem tednu razvoja nastaneta tudi obe atrioventrikularni zaklopki, v šestem tednu razvoja pa aortna zaklopka in zaklopka pljučnega debla (5,6).

1.1.3 PRIROJENE SRČNE NAPAKE

Prirojene anomalije so vse strukturne, funkcionalne in biokemično-molekularne napake, ki so nastale v obdobju od oploditve do rojstva otroka in so prisotne ob rojstvu. Strukturne prirojene anomalije so srčne napake, ki so posledica nepravilnega razvoja srca ploda med nosečnostjo, oziroma nepopolnega razvoja srca v prvih šestih tednih nosečnosti. O prirojenih srčnih napakah torej govorimo, kadar so prisotne strukturne nepravilnosti sten srčnih votlin, zaklopk ali velikih žil, ki vodijo v srce ali pa iz srca. Vzroki za pojav prirojenih srčnih napak so številni in nejasni, lahko so posledica genetskih sprememb, kromosomskih nepravilnosti ali vplivov iz okolja (7).

Za razdelitev in poimenovanje prirojenih srčnih napak je najprej potrebna ocena položaja srca v prsnem košu. Srce lahko najdemo bolj na levi oz. desni strani prsnega koša ali v sredini. Prav tako je potrebno oceniti položaj srčne konice, ki je lahko usmerjena v levo, desno ali na sredino. Nato po posameznih segmentih opišemo srce (preddvor, prekat, velike žile) in ocenimo povezanost teh segmentov. Na tak način lahko prirojene srčne napake razdelimo v 4 skupine, in sicer:

- acianotične prirojene srčne napake z levo-desnim šantom,
- acianotične prirojene srčne napake brez šanta,
- cianotične prirojene srčne napake in

- druge srčne napake, kamor uvrščamo kongenitalno korigirano transpozicijo velikih žil (7,8).

Normalno teče venska kri iz telesa v desni preddvor in desni prekat ter nato po pljučni arteriji v pljuča, kjer se oksigenira in vrne v levi del srca ter nazaj v telo. Pri acianotičnih prirojelih srčnih napakah, kjer je prisoten levo-desni šant, pa del krvi, ki se oksigenira v pljučih, ne teče iz levega dela srca po telesu, temveč se vrne v pljuča. Posledično telo ni preskrbljeno z zadostno količino kisika. V to skupino acianotičnih prirojelih srčnih napak z levo-desnim šantom prištevamo:

- defekt v preddvornem pretinu,
- defekt v prekatnem pretinu,
- šant med aorto in desnimi srčnimi votlinami,
- šant na ravni velikih arterij, kamor sodi tudi odprt Bottalov vod (7).

Acianotične prirojene srčne napake brez šanta delimo glede na stran srca, v kateri je prisotna anomalija, torej na anomalije leve in desne strani srca. Anomalije leve strani srca so:

- prirojena obstrukcija vtoka v levi prekat,
- mitralna regurgitacija,
- aortna stenoza,
- aortna regurgitacija in
- koarktacija aorte (7).

Anomalije desne strani srca pa so:

- acianotična Epsteinova anomalija,
- pulmunalna stenoza,
- prirojena pulmonalna regurgitacija in
- idiopatska dilatacija pulmunalne arterije (7).

Tretja skupina prirojelih srčnih napak so cianotične prirojene srčne napake. Le-te, glede na pljučni pretok delimo v dve skupini. Cianotične srčne napake s povečanim pljučnim pretokom so:

- kompletna transpozicija velikih arterij,
- dvojni iztok iz desnega prekata brez pulmunalne stenoze,
- truncus arteriosus,
- totalni anomalni pulmunalni venski priliv,
- enojni prekat brez pulmunalne stenoze,

- enojni preddvor in
- sindrom hipoplastičnega levega srca (7).

Cianotične srčne napake z normalnim ali zmanjšanim pljučnim pretokom pa so:

- triskubidalna atrezija,
- Epsteinova anomalija z desno-levim šantom,
- pulmunalna atrezija z defektom v prekatnem pretinu in
- tetralogija Fallot (7).

1.1.4 NAJPOGOSTEJŠE PRIROJENE SRČNE NAPAKE

Vsak stoti živorojeni otrok se rodi s prirojeno srčno napako. Statistika kaže, da so v Sloveniji najpogostejše srčne napake defekt v prekatnem srčnem pretinu, defekt v preddvornem srčnem pretinu, odprt Botallov vod, stenoza pulmonalne zaklopke, koarktacija aorte, aortna stenoza, tetralogija Fallot in transpozicija velikih žil (2,9). Opisane so v preglednici I in razdeljene glede na delež vseh prirojenih srčnih napak.

Preglednica I: Kratak opis in delež najpogostejših prirojenih srčnih napak (7,8)

DEFEKT V PREKATNEM SRČNEM PRETINU – 30%

Srce ima lahko majhno ali veliko napako, oziroma defekt v prekatnem srčnem pretinu. Prisoten je levo-desni šant.

DEFEKT V PREDDVORNEM SRČNEM PRETINU – 10%

Pri defektu v preddvornem srčnem pretinu gre za pomanjkljivosti te srčne pregrade. Prisoten je levo-desni šant.

ODPRT BOTALLOV VOD – 10%

Odprt Botallov vod je povezava med začetnim delom aorte in pljučno arterijo. Normalno se vod po rojstvu zapre. Zaradi odprtega voda je praviloma prisoten levo-desni šant.

STENOZA PULMONALNE ZAKLOPKE – 7%

O stenozni pljučne zaklopke govorimo, kadar pride do zožitve pljučne zaklopke, kar pomeni, da mora desni prekat z višjim tlakom pognati kri skozi zaklopko.

KOARKTACIJA AORTE – 7%

Koarktacija aorte pomeni zožitev aorte, posledično je zmanjšan pretok krvi v spodnjo polovico telesa.

AORTNA STENOZA – 6%

Pri aortni stenozi je odprtina aortne zaklopke ožja, kar moti pretok krvi, zato mora prekat z večjim tlakom pognati kri skozi zoženo zaklopko.

TETRALOGIJA FALLOT – 6%

Pri tetralogiji Fallot gre za kombinacijo štirih napak: defekt v prekatnem srčnem pretinu, obstrukcija iztoka iz desnega prekata, hipertrofija desnega prekata in jahajoča aorta. Prisoten je tudi levo-desni šant, bolniki so cianotični.

TRANSPOZICIJA VELIKIH ŽIL – 4%

Pri transpoziciji velikih žil oziroma arterij je aorta povezana z desnim ventrikulom, z levim pa je povezana pljučna arterija. Kri zato ne teče v pljuča, deoksigenirana kri se namreč iz telesa vrne v desni prekat in nato nazaj v aorto.

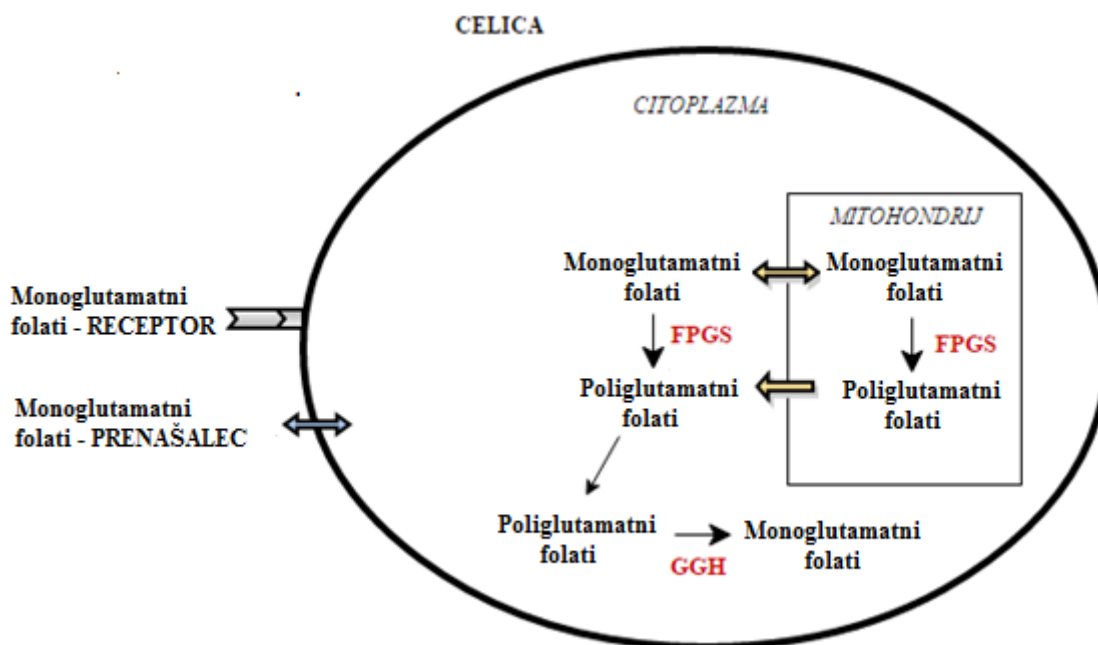
1.2 FOLATI

Folna kislina oziroma folati so vodotopni vitamini, ki spadajo v skupino B vitaminov, natančneje vitamin B9. Kemijsko so sestavljeni iz pteridinskega obroča, para-aminobenzojske kisline in glutamata. Izraz folati se uporablja za vse naravne oblike folatov, izraz folna kislina pa za sintezne oblike. Ker človek sam ne more sintetizirati folatov, jih mora vnesti v telo s hrano ali s prehranskimi dopolnili. Glavni vir folatov v naravi je sveža ali zamrznjena zelena listnata zelenjava, citrusi, žita in stročnice. Naravni folati se večinoma nahajajo v poliglutamati obliki, in sicer glavni obliki sta 5-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF) in 10-formiltetrahidrofolat (10-formilTHF). V prehranskih dopolnilih se največkrat uporablja folna kislina, ki ima samo en ostanek glutamata, ali pa biološko najbolj uporabna oblika 5-metilTHF monoglutamat oziroma metafolin (9,10,11). Folati imajo pomembno vlogo v človeškem telesu. Potrebni so za nastajanje nukleotidov, ki so nujni za sintezo ali popravilo DNA. Kot koencim sodelujejo v reakcijah, kjer se prenašajo skupine z enim ogljikovim atomom. Vir skupin z enim ogljikovim atomom je katabolizem aminokislin serina, histidina in purina. Folati so tudi ključni v reakcijah metilacije DNA in so pomembni za remetilacijo plazemskega homocisteina v metionin. Povišane koncentracije homocisteina lahko namreč delujejo nevrotoksično, vplivajo na delovanje glutamatnih receptorjev in kalcijevih kanalčkov, inducirajo oksidativni stres, kar vodi v nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti, lahko pa tudi aktivirajo apoptotične kaskadne reakcije (9, 12, 13, 14). Potrebna je kombinacija tako folatov v prehrani kot tudi v prehranskih dopolnilih, da se zadovolji predvidene dnevne

potrebe po folatih. Te znašajo za ženske v rodni dobi 400 µg, v času nosečnosti pa se zvišajo za približno 200 µg in so 520–600 µg na dan, saj so folati potrebni za normalen plodov razvoj, za pospešeno delitev celic, sintezo DNA ter aminokislin. Povečan vnos folatov za preprečevanje prirojenih srčnih napak je pomemben predvsem v prvih tednih nosečnosti, saj se takrat razvija plodovo srce (5, 9).

1.2.1 ABSORPCIJA IN PRESNOVA FOLATOV

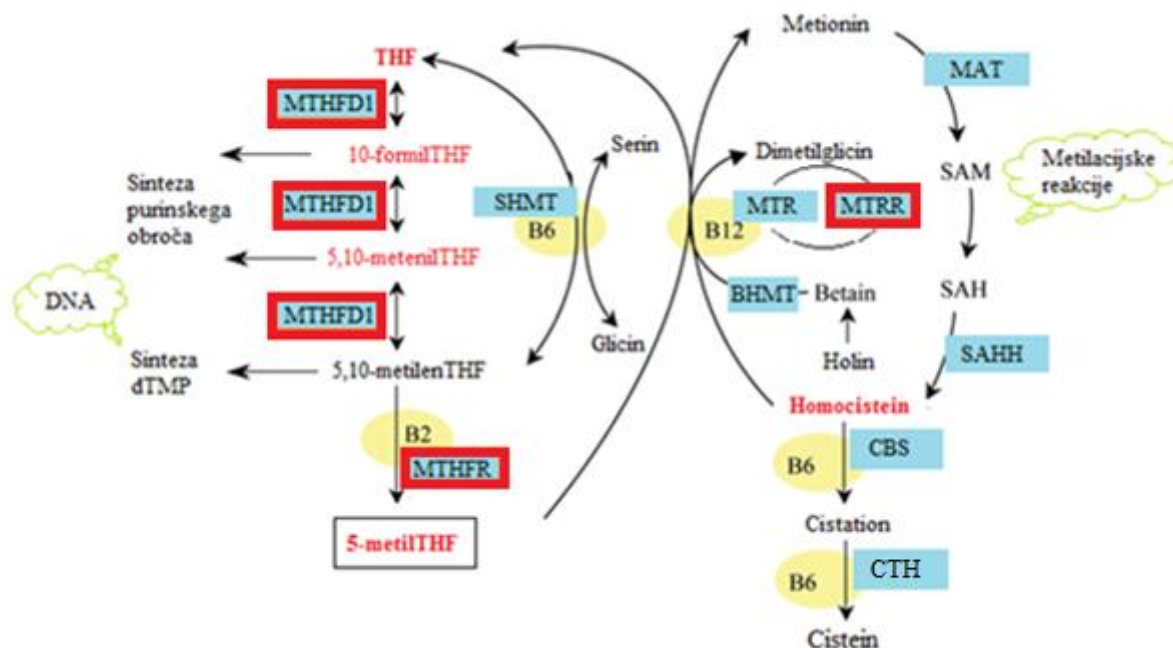
Absorpcija folatov poteka v tankem črevesju, v duodenumu in jejunumu, absorbirajo pa se lahko le monoglutamatne oblike, in sicer 5-metilTHF monoglutamat. Prav zato v črevesju encim γ glutamil hidrolaza (GGH) katalizira reakcijo, v kateri iz poliglutamatne oblike nastanejo monoglutamatne oblike folatov, ki se lahko absorbirajo (12, 13). V črevesju se folati oziroma folna kislina nahajajo v anionski obliki in se absorbirajo preko ionsko-izmenjevalnega mehanizma. Vstop iz tankega črevesja v enterocit jim omogoča visoko afinitetni s protoni sklopljen folatni receptor PCFT1 (ang. *proton-coupled folate receptor*). Nadaljnja presnova folatov poteka v celici, in sicer v celični citoplazmi in v mitohondrijih. Po vstopu v celice potekajo različne reakcije, med drugim tudi reakciji redukcije in poliglutamacije, katerih produkti nato vstopijo v cikel presnove folatov, ki je tesno povezan s ciklom presnove vitamina B12, ciklom remetilacije homocisteina v metionin in samo presnovo homocisteina. Reakcijo poliglutamacije, dodatek 2 do 9 glutamatov, katalizira encim folilpoliglutamat sintaza (FPGS). Redukcijo katalizira encim dihidrofolat reduktaza (DHFR), pri tem nastane dihidrofolat (DHF) in iz DHF nastane tetrahidrofolat (THF). Le-ta je izvorna oblika za vse nadaljnje biološko aktivne oblike tega vitamina. Iz njega nastane glavna monoglutamirana oblika, 5-metilTHF, ki kroži po krvnem obtoku in vstopa v celice preko specifičnih visoko afinitetnih glikoproteinskih receptorjev FR- α ali prenašalcev reduciranih folatov (RFC1). Koncentracija folatov v krvni plazmi je 3–30 ng/mL. 30–40% folatov je vezanih na plazemske proteine, največ na albumin, alfa-2-makroglobulin in transferin. Regulacija količine folatov v celici je kompleksna, na njo vpliva tako poliglutamacija, prevzem v celice, izvoz iz celice kot tudi katabolizem. Približno enak nivo folatov se nahaja tako v citoplazmi kot tudi v mitohondrijih. V celici se monoglutamatne oblike ne kopičijo in se lahko prenašajo iz citoplazme v mitohondrij in obratno preko RFC1. Kopičijo se samo poliglutamatne oblike, reakcija poliglutamacije pa poteka v citoplazmi in tudi v mitohondrijih, vendar se količina poliglutamatnih folatov v citoplazmi in mitohondrijih razlikuje (10, 11,12).



Slika 2: Shematski prikaz reakcij poliglutamacije in hidrolize (12). FPGS: folilpoliglutamat sintaza; GGH: γ glutamil hidrolaza.

V reakciji remetilacije homocisteina v metionin sodeluje 5-metilTHF kot donor metilne skupine in se pri tem preobrazi v THF. Reakcijo katalizira od vitamina B12 oziroma od kobalamina odvisen encim, metionin sintaza (MTR). Metilna skupina se iz 5-metilTHF prenese na kobalamin in nato iz kobalamina na homocistein. Pri tem se kobalamin oksidira in tako postane encimski kompleks kobalamin-MTR inaktiven. Ključno vlogo v remetilaciji ima tudi encim metionin sintaze reduktaza (MTRR), ki obnavlja aktivnost MTR z reduktivno metilacijo kobalamina. Nastali THF je del cikla presnove folatov. V reverzibilni reakciji se pretvori v 5,10-metilenTHF, ki je potreben za sintezo gradnikov DNA, in sicer deoksitimidin monofosfata (dTMP) iz deoksiuridilat monofosfata (dUMP). Nastanek dTMP katalizira encim timidilat sintaza (TYMS). Encim, ki katalizira reakcijo v kateri nastane 5,10-metilenTHF, je od piridoksalfosfata oziroma od vitamina B6 odvisen encim serin hidroksimetiltransferaza (SHMT). Kot donor skupine z enim ogljikovim atomom v tej reakciji sodeluje serin, ki se pri tem pretvori v glicin. Prav tako pa lahko nastane 5,10-metilenTHF v reakciji, ki jo katalizira encim metilentetrahidrofolat dehidrogenaza (MTHFD1), ki ima tri funkcije. Ima formiltetrahidrofolat sintetazno, metenil tetrahidrofolat ciklohidrolazno in metilen tetrahidrofolat dehidrogenazno aktivnost. Tako iz THF nastaneta najprej 10-formilTHF in 5,10-metenilTHF, ki sta potrebna tudi za

sintezo purinskega obroča, nato nastane 5,10-metilenTHF. Irevezibilno redukcijo 5,10-metilenTHF v 5-metilTHF katalizira encim metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), ki je od vitamina B2 odvisen encim. Nastali 5-metilTHF se zopet uporabi za remetilacijo homocisteina v metionin (10,13,15). V presnovi folatov je pomembno razmerje med 5,10-metilenTHF in 5-metilTHF. Zvišano razmerje vodi v povečano sintezo dTMP, znižano pa v sintezo metionina (15). Metionin se nadalje preobrazi v S-adenozil metionin (SAM) v reakciji, ki jo katalizira encim metionin adenziltransferaza (MAT). SAM služi kot donor metilne skupine v metilacijskih reakcijah, vključno z metilacijo nukleinskih kislin, proteinov in lipidov. Prav tako je SAM donor metilne skupine za reaktivacijo MTR. Nastane S-adenozil homocistein (SAH), ki hidrolizira v adenzil in homocistein. Reakcijo hidrolize katalizira encim S-adenozil homocistein hidrolaza (SAHH). Nadalje v presnovi homocisteina pod vplivom encima cistationin β sintaza (CBS), ki je od vitamina B6 odvisen encim, nastane cistation, iz cistationa pa aminokislina cistein. Reakcijo nastanka cisteina prav tako katalizira od vitamina B6 odvisen encim cistationin γ liaza (CTH). V jetrih in ledvicah obstaja tudi alternativni remetilacijski sistem, in sicer preko encima betain: homocistein metiltransferaza (BHMT). Le-ta prenaša metilno skupino iz betaina na homocistein in pri tem nastane metionin in dimetilglicin (16,17,18).



Slika 3: Shematski prikaz povezanosti cikla presnove folatov s presnovo vitamina B12, remetilacijskim ciklom in presnovo homocisteina (11).

Encimi, ki so obravnavani v magistrski nalogi, so obrobjeni z rdečo barvo. THF: tetrahidrofolat; MTHFD1: metilentetrahidrofolat dehidrogenaza; MTHFR: metilentetrahidrofolat reduktaza; SHMT: serin hidroksimetiltransferaza; dTMP: deoksitimidin monofosfat; MTR: metionin sintaza; MTRR: metionin sintaze reduktaza; BHMT: betain: homocistein metiltransferaza; MAT: metionin adenziltransferaza; SAM: S-adenozil metionin; SAH: S-adenozil homocistein; SAHH: S-adenozil homocistein hidrolaza; CBS: cistationin β sintaza; CTH: cistationin γ liaza.

1.2.2 POLIMORFIZMI V GENIH ZA ENCIME, KI SODELUJEJO PRI PRESNOVI FOLATOV

Polimorfizmi posameznih nukleotidov ali SNP-ji so genske variacije v enem nukleotidu, ki so prisotne pri več kot 1% populacije. S SNP-ji v genih, ki sodelujejo pri presnovi folatov, ter nezadostnim vnosom folatov in drugih vitaminov pred in med nosečnostjo povezujejo nastanek prirojenih napak ploda, med drugimi prirojene srčne napake, napake nevralne cevi ter orofacialne shize. SNP-ji lahko vplivajo na strukturo, stabilnost in funkcijo proteinov ter posledično na presnovo folatov. Tako motijo normalen razvoj ploda. Prizadet je remetilacijski cikel in sinteza DNA. V krvi se posledično poveča nivo homocisteina, ki ga povezujejo z večjim tveganjem za pojav prirojenih srčnih napak zaradi njegovih škodljivih učinkov. Homocistein je tudi biomarker motene presnove folatov. Prav tako se v krvi poveča nivo SAH, ki je potencialni inhibitor metilacijskih reakcij (10,12,18,19).

1.2.3 MTHFR rs1801133 C>T, rs1801131 A>C

Najpomembnejši encim v presnovi folatov je MTHFR (EC 1.5.1.20). Katalizira ireverzibilno redukcijo 5,10-metilenTHF v 5-metilTHF. Gen za MTHFR se nahaja na kromosomu 1 na mestu 1p36.3 in ima 11 eksonov. Poznanih je več polimorfizmov, najpogostejša in klinično najbolj pomembna pa sta polimorfizma posameznih nukleotidov rs1801133 677 C>T v eksonu 4 in rs1801131 1298 A>C v eksonu 7 (15, 20, 21, 22).

Pri polimorfizmu 677 C>T (rs1801133) gre za substitucijo enega nukleotida, citozin se zamenja s timidinom, kar povzroči spremembo aminokislina alanin v valin in posledično je spremenjeno vezavno mesto za kofaktor flavin adenin dinukleotid. Nastali protein je termolabilen in ima zmanjšano encimsko aktivnost *in vivo*. Posamezniki z genotipom 677TT imajo kar za 70% zmanjšano encimsko aktivnost, tisti z genotipom 677CT pa za 35–40% zmanjšano encimsko aktivnost (9, 10, 20, 23). Zaradi zmanjšane encimske

aktivnosti nastane manj 5-metilTHF, posledično se poveča količina homocisteina v plazmi, ki pa predvsem v kombinaciji z zmanjšanim vnosom folatov lahko predstavlja povečano tveganje za prirojene napake ploda, med drugim tudi srčne napake in okvare nevrnalne cevi. Ta polimorfizem ima vpliv tudi na reakcije metilacije, saj je zaradi zmanjšane encimske aktivnosti zmanjšano nastajanje metionina in SAM. V Evropi je približno 10-12% populacije homozigotov 677TT, približno 40% pa je heterozigotov 677CT (10).

Pri polimorfizmu 1298 A>C (rs1801131) pride do spremembe aminokislinske glutamin v alanin, kar je posledica substitucije enega nukleotida, zamenjave adenina s citozinom. Nastali protein ima zmanjšano encimsko aktivnost *in vivo*. Posamezniki z genotipom 1298CC imajo za 40% zmanjšano encimsko aktivnost glede na genotip 1298AA, vendar naj to ne bi vplivalo na količino homocisteina v plazmi. Hiperhomocistenemija, s katero povezujejo večje tveganje za pojav prirojenih srčnih napak, se lahko pojavi le, če sta prisotna oba polimorfizma, tako 677 C>T, kot tudi 1298 A>C. V Evropi je približno 10% populacije homozigotov za genotip 1298CC (9, 21).

Ward in Reilly s sodelavci sta leta 2013 izvedla pregled šestih meta analiz. Nista dokazala povezave med genotipom 677TT in večjim tveganjem za pojav prirojenih srčnih napak v severnoameriški populaciji. Ker pa so genotip 677TT povezali z večjim tveganjem pri azijski populaciji in populaciji Bližnjega vzhoda, so prišli do zaključka, da poleg genotipa vplivajo na povečano tveganje za prirojene srčne napake tudi okoljski dejavniki, in sicer vnos folatov (17). Prav tako v študiji primerov in kontrol, ki je bila izvedena na Nizozemskem, niso uspeli dokazati vpliva teh polimorfizmov na tveganje za pojav prirojene srčne napake, tudi ne v kombinaciji z nejemanjem folatnih pripravkov (23). Na Kitajskem sta Shi in Yang s sodelavci v otroški bolnišnici Nanjing izvedla študijo, v kateri sta med drugim preučevala genetske dejavnike, ki vplivajo na tveganje za pojav srčne napake. Uspeli so dokazati statistično značilno razliko v frekvencah genotipov MTHFR rs1801131 in rs1801133 med kontrolno in preiskovano skupino, vendar pa so z vključitvijo okoljskih dejavnikov (spol otroka, izobrazba in poklic matere, prisotnost pozitivne družinske anamneze, število splavov in prekinitev nosečnosti, izpostavljenost nekaterim zdravilom in drugi) uspeli dokazati le vpliv rs1801131 1298 A>C. Matere z mutiranim genotipom 1298CC so imele namreč večje tveganje za pojav prirojene srčne napake pri otroku (24). Vpliv polimorfizmov MTHFR rs1801131 in rs1801133 na tveganje za prirojene srčne napake, natančneje Tetralogijo Fallo, so ocenjevali tudi v študiji na Kitajskem v bolnišnici Xin Hua. Pri tem so uspeli dokazati le povezavo med

polimorfizmom MTHFR C677T rs1801133 in Tetralogijo Fallot. V populaciji, kjer je prisotna Tetralogija Fallot, so imeli namreč statistično značilno večjo frekvenco mutiranih genotipov 677TT v primerjavi s kontrolno skupino (14). Na medicinski fakulteti na Kitajskem je Xu s svojimi sodelavci preučeval povezavo polimorfizma rs1801133 677 C>T in tveganjem za razvoj prirojene srčne napake. V ta namen so izvedli meta analizo, za katero so podatke pridobili v različnih študijah. Vključili so 20 študij. Ugotovili so povezavo med mutiranim genotipom 677TT pri otroku in pojavnostjo prirojene srčne napake, niso pa uspeli dokazati vpliva materinega genotipa (25). Na Kitajskem so izvedli tudi meta analizo iz 35 študij. Njen namen je bil oceniti povezavo med polimorfizmi v genu MTHFR in tveganjem za pojav prirojene srčne napake. V študijo so vključili kar 9329 primerov in 15076 kontrol. Prišli so do zaključka, da prisotnost mutiranega alela T (677 C>T) poveča dovzetnost za razvoj prirojene srčne napake, še posebej v azijski populaciji mater in otrok. Prav tako pa so ugotovili, da kot faktor tveganja v evropski populaciji otrok nastopa mutiran alel C (1298 A>C) (26). Drugo meta analizo sta na Kitajskem naredila Wang in Hou. Preučevali so povezavo polimorfizmov 677 C>T (rs1801133) in 1298 A>C (rs1801131) pri bolnikih s prirojeno srčno napako in njihovih materah. Prišli so do zaključka, da so lahko tako genetski kot okoljski dejavniki vzrok za pojav prirojene srčne napake. V meta analizi niso ugotovili statistično značilne razlike v porazdelitvi genotipov polimorfizma 677 C>T med materami bolnikov s prirojeno srčno napako in kontrolo. Delno so sicer odkrili povezavo med mutiranim genotipom 677TT pri materah v azijski populaciji, niso pa odkrili te povezave v evropski populaciji, kar kaže na morebitni vpliv okoljskih dejavnikov in različnega genetskega ozadja. Odkrili so tudi vpliv polimorfizma 677 C>T pri otrocih, ki rezultira v manjši encimski aktivnosti, in večjim tveganjem za prirojene srčne napake. Ta vpliv je zopet bolj izražen v azijski populaciji otrok z mutiranim genotipom 677TT kot v evropski populaciji. Niso pa uspeli dokazati vpliva polimorfizma 1298 A>C (rs1801131) na tveganje za prirojene srčne napake pri materah in otrocih (27). Vpliv polimorfizmov 677 C>T (rs1801133) in 1298 A>C (rs1801131) na tveganje za pojav prirojene srčne napake so preučevali tudi v egipčanski populaciji, in sicer v študiji, ki so jo izvedli na medicinski fakulteti v Egiptu. Zidan s sodelavci je ugotovil statistično značilno razliko v frekvencah genotipov. Več je bilo mutiranih homozigotov 1298CC in 677TT v preiskovani skupini otrok in mater kot v kontrolni skupini. V populaciji otrok so ugotovili, da imajo mutirani homozigoti z genotipom 677TT ali 1298CC večje tveganje za pojav prirojene srčne napake, genotipa

677CT in 1298AC pa naj ne bi vplivala na to tveganje. V populaciji mater so dokazali večjo frekvenco genotipov 1298AC in CC v preiskovani skupini, niso pa našli vpliva polimorfizma 677 C>T na tveganje za razvoj prirojene srčne napake. V primerjavi s kontrolno skupino so imeli otroci v preiskovani skupini večji nivo homocisteina (28). V Indiji so raziskovali povezavo šestih polimorfizmov v presnovi folatov in tveganjem za razvoj prirojenih srčnih napak. Izvedli so študijo primerov in kontrol, ki je vključevala le 96 bolnikov s prirojeno srčno napako in 100 zdravih prostovoljcev. Med drugimi preučevanimi polimorfizmi sta bila tudi polimorfizma 677 C>T (rs1801133) in 1298 A>C (rs1801131). Prišli so do zaključka, da genotip 1298CC statistično značilno poveča tveganje za razvoj prirojene srčne napake, polimorfizem 677 C>T pa na to tveganje ne vpliva (29). V Turčiji je Kocakap s sodelavci izvedel raziskavo, v kateri so določali ali sta polimorfizma 677 C>T (rs1801133) in 1298 A>C (rs1801131) povezana z razvojem prirojenih srčnih napak. Ugotovili so, da je pri otrocih frekvenca mutiranih genotipov 1298CC in 1298AC statistično značilno večja v preiskovani skupini kot v kontrolni skupini, kar pomeni, da prisotnost C alela na mestu 1298 pri otroku poveča tveganje za razvoj prirojene srčne napake. Čeprav oba preiskovana polimorfizma vplivata na encimsko aktivnost MTHFR, pa je porazdelitev genotipov polimorfizma 677 C>T primerljiva med preiskovano in kontrolno skupino (30).

1.2.4 MTRR rs1801394 A>G

Zelo pomemben encim v reakciji remetilacije homocisteina v metionin je MTRR (EC 2.1.1.135), ki je pomemben za obnovitev aktivnosti encimskega kompleksa MTR-kobalamin. Gen za MTRR se nahaja na kromosomu 5, lokus 5p15.2-p15.3 in obsega 15 oziroma 14 eksonov. Pri polimorfizmu 66 A>G (rs1801394) pride do zamenjave enega nukleotida, adenina z gvaninom, pri tem se spremeni aminokislina izolevcin v metionin. Nastali protein ima različne biokemijske lastnosti *in vitro*, zmanjšana encimska aktivnost pa rezultira v pomanjkljivem delovanju encima MTR in posledično pomanjkljivem nastajanju metionina in SAM. Homozigoti za mutiran genotip 66GG imajo v kombinaciji s pomanjkanjem vitamina B12 v plazmi povišan nivo homocisteina. Porazdelitev genotipov v populaciji je odvisna od geografskih dejavnikov, oziroma od etnične pripadnosti. Ocenjena pogostnost mutiranega genotipa 66GG je v evropski populaciji približno 50 % (9,15,31).

V študiji na Nizozemskem, ki so jo izvedli v centru za bolezni srca otrok, je van Beynum s sodelavci ugotovil, da mutiran genotip 66GG ni povezan s povečanim tveganjem za pojav prirojene srčne napake (31). Wang s sodelavci je raziskoval povezavo med prirojenimi srčnimi napakami in dvanajstimi polimorfizmi, ki so vključeni v metabolizem folatov. Med drugimi tudi polimorfizem 66 A>G (rs1801394). Niso ugotovili vpliva prisotnosti mutiranega G alela (genotipa 66GA ali 66AA) pri materi ali otroku na tveganje za pojav prirojenih srčnih napak. Uspeli so celo dokazati, da mutiran genotip ne vpliva na katalitično aktivnost encima MTRR (32). Tem raziskavam nasprotuje meta analiza, ki sta jo na Kitajskem izvedla Cai in Zhang s sodelavci, v kateri so ugotovili, da je pri otrocih prisotnost mutiranega G alela v genu za MTRR povezana s povečanim tveganjem za prirojene srčne napake. V meta analizo so bile vključene vse študije primerov in kontrol, ki so preučevale povezavo med polimorfizmom 66 A>G (rs1801394) in pojavnostjo prirojenih srčnih napak (33). Prav tako so v raziskavi, ki so jo izvedli v bolnišnici na Kitajskem na oddelku za pediatrično kardiologijo, dokazali povezavo med mutiranim genotipom 66GG in tveganjem za pojav prirojene srčne napake. Prisotnost mutiranega genotipa 66GG je bila statistično značilno večja v skupini bolnikov z defektom v preddvornem srčnem pretinu. Prav tako pa je bila prisotnost mutiranih genotipov 66AG in 66GG statistično značilno večja v skupini bolnikov z defektom v prekatnem srčnem pretinu (34). Vpliv polimorfizma 66 A>G je preučeval tudi Rozen s sodelavci v Kanadi. V nasprotju z drugimi raziskavami so ugotovili, da pri otrocih prisotnost mutiranega genotipa 66AG in 66GG zmanjša tveganje za pojav prirojene srčne napake oziroma zmanjša tveganje za defekt v prekatnem srčnem pretinu (9).

1.2.5 MTHFD1 rs2236225 G>A

Encim MTHFD1 (EC 1.5.1.5) ima tri aktivnosti, gen MTHFD1 pa se nahaja na kromosomu 14, na mestu 14q23.3 in obsega 28 eksonov. Pri polimorfizmu 1958 G>A (rs2236225) pride do zamenjave aminokislina arginin v glicin (35,36). To lahko vodi v pomanjkljivo encimsko aktivnost, kar moti presnovo folatov in remetilacijo homocisteina v metionin. Ocenjena pogostnost mutiranega genotipa 1958AA v evropski populaciji je približno 20 % (37,38,39).

V študiji na Kitajskem, v provinci Liaoning, so hoteli dokazati povezavo med mutiranim genotipom 1958AA in tveganjem za pojav prirojenih srčnih napak. Primerjali so genotipe v skupini bolnikov s prirojeno srčno napako in v kontrolni skupini, vendar niso ugotovili

statistično značilne razlike med skupinama. Med skupinama so primerjali tudi nivo folne kisline in homocisteina. V serumu so meritve pričakovano pokazale manjšo količino homocisteina in večjo količino folne kisline v kontrolni skupini (38). V študiji v pokrajini Quebec v Kanadi so prav tako raziskovali vpliv polimorfizma 1958 G>A (rs2236225) na tveganje za pojav prirojene srčne napake. Ugotovili so, da ta polimorfizem rezultira v zmanjšani stabilnosti encima in posledično tudi poveča tveganje za pojav prirojene srčne napake. Medtem ko naj bi otroci v preiskovani skupini z mutiranim genotipom 1598AA imeli večje tveganje za razvoj prirojene srčne napake kot tisti v kontrolni skupini, pri materah niso uspeli dokazati vpliva mutiranega genotipa 1598AA na to tveganje (39). Vpliv polimorfizma 1958 G>A (rs2236225) na tveganje za prirojene srčne napake, natančneje Tetralogijo Fallot, so skupaj s drugimi polimorfizmi preučevali tudi v študiji na Kitajskem, v bolnišnici Xin Hua. V tej raziskavi niso odkrili statistično značilne razlike v prisotnosti mutiranega genotipa ter genotipa divjega tipa med kontrolno skupino in skupino bolnikov s Tetralogijo Fallot (14).

2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo analizirali vpliv izbranih polimorfizmov v genih za encime, ki sodelujejo v presnovi folatov na pojav prirojenih srčnih napak. Folati imajo pomembno vlogo v telesu, še posebej v času nosečnosti, potrebni so namreč za normalen razvoj ploda, med drugim imajo vpliv na metilacijo DNA, vplivajo na razpoložljivost nukleotidov za sintezo in popravilo DNA ter imajo vlogo v remetilacijskem ciklu metionina. Vpliv teh polimorfizmov na pojavnost prirojenih srčnih napak so dokazali v nekaterih študijah, vendar je le-teh zelo malo. Prav tako si včasih rezultati študij nasprotujejo. Namen magistrske naloge bo:

1. Analizirati vpliv izbranih polimorfizmov v genih MTHFR, MTHFD1 in MTRR, v parih mater in otrok, na prisotnost prirojene srčne napake pri otroku.
2. Analizirati tudi okoljske dejavnike, ki bi lahko imeli vpliv na pojav prirojenih srčnih napak, to so telesna višina matere, starost matere ob zanositvi, telesna masa matere ob zanositvi, spol otroka, morebitno kajenje matere, kajenje matere v nosečnosti, izobrazba matere, število nosečnosti, število živorojenih otrok, število spontanih splavov oziroma spodbujenih prekinitev nosečnosti, družinska anamneza, tip in število prirojenih napak v družini, število sorodnikov s prirojeno napako, prisotnost sladkorne bolezni matere ob zanositvi, prisotnost gestacijskega diabetesa, prisotnost drugih kroničnih bolezni, jemanje protiepileptičnih in drugih zdravil v nosečnosti, prisotnost povišane telesne temperature v nosečnosti, jemanje folatnih pripravkov pred zanositvijo in po zanositvi, sodelovalnost oziroma rednost jemanja folatnih pripravkov, jemanje drugih prehranskih dodatkov v času nosečnosti in ocena zaužite količine metionina in folne kisline na mesec s prehrano.
3. Poleg vpliva posameznih polimorfizmov na pojav prirojenih srčnih napak v slovenski populaciji želimo ugotoviti tudi vpliv kombinacije polimorfizmov MTHFR, MTRR, MTHFD1 na pojav prirojenih srčnih napak v slovenski populaciji otrok, katerih matere niso uživale prehranskih dopolnil s folati v času nosečnosti, saj se za omenjene polimorfizme domneva, da zadosten vnos folatov v nosečnosti lahko ublaži ali izniči njihov vpliv.

V ta namen bomo izolirali DNA iz brisa bukalne sluznice otrok s prirojeno srčno napako in njihovih mater ter zdravih otrok in njihovih mater. Nato bomo določili genotipe izbranih

encimov v presnovi folatov in jih primerjali med obema skupinama mater in otrok. Matere bodo tudi izpolnile anketni vprašalnik, ki nam bo pomagal določiti vpliv okoljskih dejavnikov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI IN POTEK ŠTUDIJE

V študijo sta bili vključeni dve skupini, testna in kontrolna. V vsaki so bili vključeni pari mati in otrok. V **testni skupini (TS)** je sodelovalo 150 parov mater in otrok, pri katerih so imeli otroci prisotno prirojeno srčno napako, največkrat so bile postavljene naslednje diagnoze: defekt v ventrikularnem srčnem pretinu (40%), defekt v preddvornem srčnem pretinu (30%), aortna stenoza (10%), koarktacija aorte (7,5%), tetralogija Fallot (6,5%), pulmonalna stenoza (4%), transpozicija velikih žil (3,5%) in hipoplastično levo srce (2%). Pri nekaterih bolnikih je bilo prisotnih več okvar hkrati. TS je vključevala naključno izbrane bolnike Službe za kardiologijo Pediatrične klinike UKC, ki so prišli na kontrolni pregled v obdobju od marca 2014 do septembra 2015. V **kontrolni skupini (KS)** je sodelovalo 199 parov mater in otrok, kjer pri otroku ni bila ugotovljena nobena izmed razvojnih nepravilnosti. KS je bila naključno izbrana in je vključevala otroke, rojene v Porodnišnici Ljubljana, v obdobju od 15.09.2014 do 20.11.2014.

Vsem sodelujočim v študiji je bil odvzet vzorec–bris bukalne sluznice. Vzorci so bili do obdelave shranjeni v hladilniku na 4 °C. Iz dobljenega brisa smo z metodo izsoljevanja izolirali DNA. Izmerili smo koncentracijo izolirane DNA ter vzorce pripravili za analizo tako, da smo jih redčili z avtoklavirano destilirano vodo do koncentracije 4 ng/μL. Redčene vzorce smo ves čas do analize hranili v hladilniku na 4 °C. Nato smo izvedli genotipizacijo polimorfizmov v genih za encime presnove folatov, in sicer:

- rs1801133 C>T v genu za MTHFR,
- rs1801131 A>C v genu za MTHFR,
- rs1801394 A>G v genu za MTRR in
- rs2236225 G>A v genu za MTHFD1.

3.2 IZOLACIJA DNA

Iz brisov ustne sluznice smo z MASTERPURE™ DNA purification kitom po navodilih proizvajalca izolirali DNA z metodo izsoljevanja. Metodo smo modificirali. Za spiranje celic iz brisa ustne sluznice smo uporabili pufer, in sicer 1xPBS pufer.

Zaradi možnosti kontaminacije s tujo DNA, delo z DNA zahteva posebno previdnost. Prav zato morajo biti vsi uporabljeni laboratorijski pripomočki avtoklavirani.

3.2.1 REAGENTI

DNA smo izolirali z naslednjimi reagenti:

- 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.
- 100% izopropanol,
- 70% etanol (EtOH).

3.2.2 INSTRUMENTI IN OPREMA

Za potrebe izolacije DNA iz bukalne sluznice smo uporabili:

- pipete Eppendorf Research (1000µL, 100µL, 2,5µL) in avtoklavirane nastavke za pipetiranje,
- 2 mL avtoklavirane Eppendorfove epruvete,
- mešalnik Vortex,
- centrifugo Eppendorf Centrifuge 5415R,
- vodno kopel Biosan WB-4MS,
- NanoDrop®ND-1000.

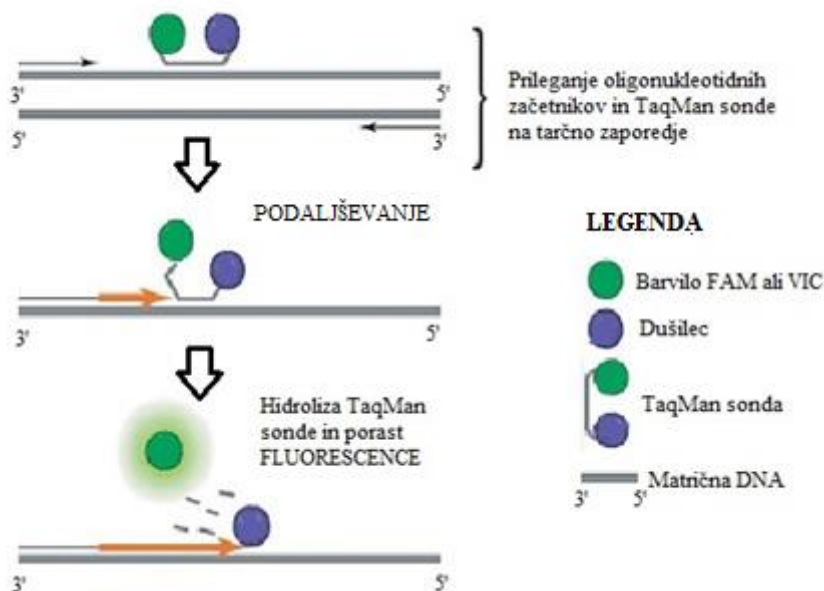
3.3 GENOTIPIZACIJA

Verižna reakcija s polimerazo (PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction) je metoda encimskega pomnoževanja nukleinskih kislin *in vitro*. Z njo lahko v zelo kratkem času iz majhnih količin matrične DNA dobimo veliko število kopij tarčne DNA. Odsek, ki ga želimo na matrični DNA pomnožiti, omejimo z dvema oligonukleotidnima začetnikoma, kot gradniki novo nastale verige pa služijo deoksinukleozid-trifosfati. Poleg matrične DNA, oligonukleotidnih začetnikov in deoksinukleozid-trifosfatov reakcijsko zmes za PCR sestavljajo še termostabilna DNA-polimeraza, magnezijevi ioni, ki služijo kot kofaktor DNA-polimeraze, in reakcijski pufer, ki uravnava pH ter tako vpliva na aktivnost in točnost DNA-polimeraze (40). Reakcija PCR poteka v več ciklih, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj, in sicer:

- prva stopnja – denaturacija (94-95 °C),
- druga stopnja – prileganje oligonukleotidnih začetnikov (40-60 °C),
- tretja stopnja – podaljševanje, sinteza komplementarne verige (72 °C).

Tarčni odsek na matrični DNA se v vsakem ciklu podvoji. Po končanem pomnoževanju sledi stopnja detekcije pomnoženih produktov (40).

Polimorfizme v presnovi folatov smo določali z metodo **PCR v realnem času**, ki omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu. Signal smo detektirali v končni točki, po končani analizi, kar pomeni, da ne gre za klasično PCR metodo v realnem času. Za detekcijo smo uporabili hidrolizirajoče TaqMan sonde, označene z VIC in FAM barvilom. Vsaka sonda se prilega na točno določeno tarčno zaporedje na matrični DNA, ena na mutirano zaporedje in druga na zaporedje divjega tipa. Pri uporabi TaqMan sond za detekcijo združimo stopnji prileganja in podaljševanja v eno stopnjo, in sicer pri temperaturi 60°C. Kadar je sonda vezana na tarčno zaporedje, dušilec na 3' koncu prestreže emitirano fluorescenco reporterskega barvila na 5' koncu, zato fluorescenca ne poraste. Med pomnoževanjem, v stopnji podaljševanja, pa Taq DNA polimeraza, ki ima 5'–3' eksonukleazno aktivnost, povzroči hidrolizo vezane sonde, kar se kaže v porastu fluorescence (40,41).



Slika 4: Slikovni prikaz genotipiziranja s hidrolizirajočimi sondami (42)

3.3.1 REAGENTI

Za izvedbo genotipizacije smo uporabili naslednje reagente:

- avtoklavirano destilirano vodo,
- TaqMan[®] Universal Master Mix II, with UNG, 2x (Applied Biosystems), ki vsebuje AmpliTaq Gold[®] DNA polimerazo, uracil-N-glikozilazo UNG, dNTP in dUTP, ROX[™] pasivno referenco in pufer,
- TaqMan[®] Assay, 20x (Applied Biosystems), ki vsebuje oligonukleotide in sonde:
 - rs1801133: C__1202883_20,
 - rs1801131: C___850486_20,
 - rs1801394: C__3068176_10,
 - rs2236225: C__1376137_10.

3.3.2 INSTRUMENTI IN OPREMA

- Roche Lightcycler 480,
- komora za sterilno delo Biosan,
- pipete Eppendorf Research (200 μ L, 20 μ L, 2,5 μ L) in avtoklavirani nastavki za pipetiranje,
- 0,5 mL avtoklavirane Eppendorfove epruvete,
- Vortex Biosan
- mikrotitrna ploščica s 384 luknjicami ter zaščitna folija za ploščico,
- ravnilo za pomoč pri pipetiranju,
- centrifuga Centric 322A.

3.3.3 POTEK DELA

Ker je PCR zelo občutljiva reakcija, smo pred začetkom dela pripravili komoro, tako da smo jo očistili s 70% EtOH. Prav tako smo s 3% hipokloritom očistili ves pribor. Vse skupaj smo za vsaj 15 minut izpostavili UV-svetlobi. V tem času smo si pripravili in premešali vzorce ter reagente za analizo.

Nato smo v prežarčeni in očiščeni komori pripravili reakcijsko mešanico, za katero smo volumne posameznega reagenta preračunali glede na število analiziranih vzorcev. Volumni reagentov za en vzorec so prikazani v spodnji preglednici II.

Preglednica II: Reakcijska mešanica za eno PCR reakcijo

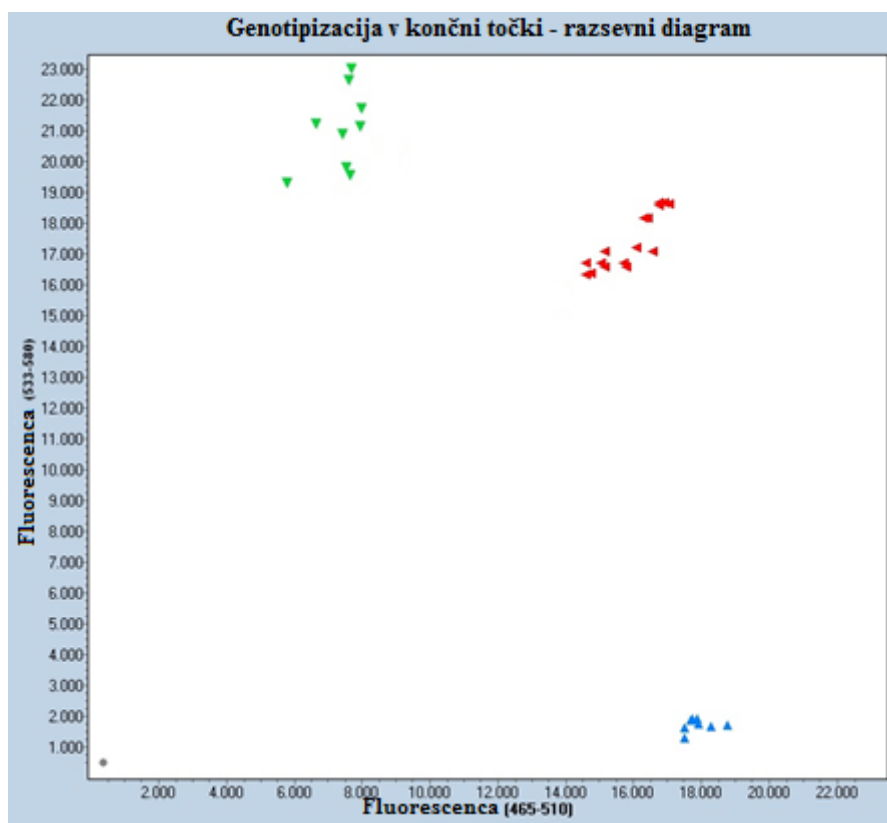
Reagenti	1x [μ L]
TaqMan [®] Universal Master Mix II, with UNG, 2x	2,5
TaqMan [®] Assay	0,125
dH ₂ O	0,875
Skupni volumen	3,5

Vsaka luknjica na mikrotitrski ploščici predstavlja eno analizo vzorca. V vsako luknjico smo odpipetirali 3,5 μ L reakcijske mešanice in 1,5 μ L vzorca raztopine DNA. Po pipetiranju smo mikrotitrsko ploščico pokrili z zaščitno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 2000 obratih/minuto. Ploščico smo po centrifugiranju vstavili v analizator Roche Lightcycler 480 ter uporabili program, prikazan v preglednici III.

Preglednica III: Nastavitve programa v Lightcycler 480

Lightcycler 480	UNG inkubacija	Aktivacija Taq DNA polimeraze	PCR	
			50 ciklov	
			Denaturacija DNA	Prileganje oligonukleotidnih začetnikov/podaljševanje
Temperatura [$^{\circ}$ C]	50	95	95	60
Čas [min]	2	10	0,25	1

Po končani reakciji smo analizirali podatke. Glede na genotip in tip fluorescence smo vzorce ločili na tri populacije.



Slika 5: Primer grafa genotipizacije v končni točki za gen MTHFD1

Na sliki 5 os X prikazuje fluorescenco barvila FAM, os Y pa fluorescenco barvila VIC. V primeru encima MTHFD1 so homozigoti za nemutirano zaporednje GG prikazani z modro barvo, z zeleno barvo pa homozigoti za mutirano zaporednje AA. Rdeča barva predstavlja populacijo heterozigotov AG. Ob vsaki analizi smo dodali tudi slepi vzorec in tako kontrolirali potencialno kontaminacijo reagentov z DNA. Na sliki slepi vzorec predstavlja siva barva.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate genotipizacije smo skupaj s podatki iz vprašalnikov obdelali s statističnim programom SPSS. Med sabo smo primerjali dva neodvisna vzorca KS in TS. Izvedli smo naslednje teste:

- Kolmogorov-Smirnov test: ugotavljanje normalnosti porazdelitve parametričnih spremenljivk,
- Mann-Whitneyev U-test: ugotavljanje razlik med KS in TS za nenormalno porazdeljene parametrične spremenljivke,

- Chi-kvadrat test: ugotavljane razlik med KS in TS za neparametrične oziroma kategorične spremenljivke,
- logistična regresija: ugotavljanje vpliva večih genetskih in okoljskih dejavnikov na nastanek prirojenih srčnih napak. Ocenili smo kakovost uporabljenega logističnega regresijskega modela. V ta namen smo izvedli Omnibus test, Hosmer-Lemeshow test in pogledali vrednost Nagelkerkejevega R^2 koeficienta.

Kot mejo statistične značilnosti smo določili $\alpha = 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 ANALIZA ANKETNEGA VPRAŠALNIKA

Primerjali smo različne spremenljivke oziroma okoljske dejavnike in njihov vpliv na pojav prirojenih srčnih napak v dveh skupinah, in sicer v KS, v kateri otroci nimajo prisotne prirojene srčne napake, in TS, v kateri imajo otroci prisotno eno izmed prirojenih srčnih napak. Izbrane spremenljivke smo razdelili v parametrične in neparametrične oziroma kategorične.

4.1.1 OPISNA STATISTIKA SPREMENLJIVK

Analizirane numerične spremenljivke so: telesna višina matere, starost matere ob vzorčenju in zanositvi, telesna masa matere ob zanositvi, indeks telesne mase matere ob zanositvi, število nosečnosti, število živorojenih otrok, število spontanih splavov oziroma prekinitev nosečnosti, ocena zaužite količine metionina in folne kisline s hrano na mesec. Število nosečnosti, število živorojenih otrok in število spontanih splavov oziroma spodbujenih prekinitev nosečnosti se že v osnovi v populaciji ne porazdeljujejo normalno, za ostale spremenljivke pa smo najprej preverili kako se te spremenljivke porazdeljujejo v KS in TS. V ta namen smo izvedli test normalnosti porazdelitve oziroma Kolmogorov-Smirnov test. Postavili smo si hipotezi, in sicer:

- H_0 , ki pravi, da se spremenljivke porazdeljujejo normalno,
- H_1 , ki pravi, da spremenljivke ne izhajajo iz normalne porazdelitve.

Kolmogorov – Smirnov test nam je podal vrednost p , ki smo jo primerjali z izbrano stopnjo tveganja α . Le-ta je bila 0,05. Pri vseh spremenljivkah je $p < \alpha$, zato lahko sklepamo, da se testirane spremenljivke v obeh skupinah ne porazdeljujejo normalno. Izjema je mejna vrednost p pri starosti matere ob zanositvi v TS. Za opis spremenljivk v kontrolni in testni skupini smo zato uporabili mediano, minimum in maksimum. Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa so razvidni v preglednici IV. Za grafični prikaz smo uporabili kvantilni diagram, kar vidimo na slikah 6–15. Iz grafičnega prikaza lahko razberemo mediano, variacijski razmik med maksimalno in minimalno vrednostjo ter zgornji in spodnji kvartil. Okvir škatle nam torej pove medkvartilni razmik, t.i. ročaji ali brki predstavljajo najvišjo in najnižjo neizstopajočo vrednost, posamezne točke na grafu pa predstavljajo izstopajoče (krogec) in ekstremno izstopajoče (zvezdica) vrednosti.

Preglednica IV: Opisna statistika parametričnih spremenljivk in rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa za normalnost porazdelitve

Spremenljivka	KONTROLNA SKUPINA				TESTNA SKUPINA			
	Mediana	Maksimum	Minimum	p*	Mediana	Maksimum	Minimum	p*
Telesna višina matere (cm)	167,0	186,0	152,0	0,038	167,0	196,0	146,0	0,005
Starost matere ob zanositvi (leta)	31,0	43,0	19,0	0,016	30,0	46,0	17,0	0,051
Telesna masa matere ob zanositvi (kg)	62,0	116,0	40,0	<0,001	64,0	116,0	43,0	<0,001
BMI matere ob zanositvi (kg/m ²)	22,1	44,8	16,4	<0,001	22,2	39,4	17,4	<0,001
Starost matere ob vzorčenju (leta)	32,0	44,0	20,0	0,011	34,0	56,0	19,0	0,027
Ocena količine zaužitega metionina mesec (g)	47,0	847,0	18,0	<0,001	44,0	448,0	0,0	<0,001
Ocena količine zaužite folne kisline na mesec (μg)	22987,0	511393,0	7766,0	<0,001	21892,0	333156,0	0,0	<0,001

*Kolmogorov-Smirnov test

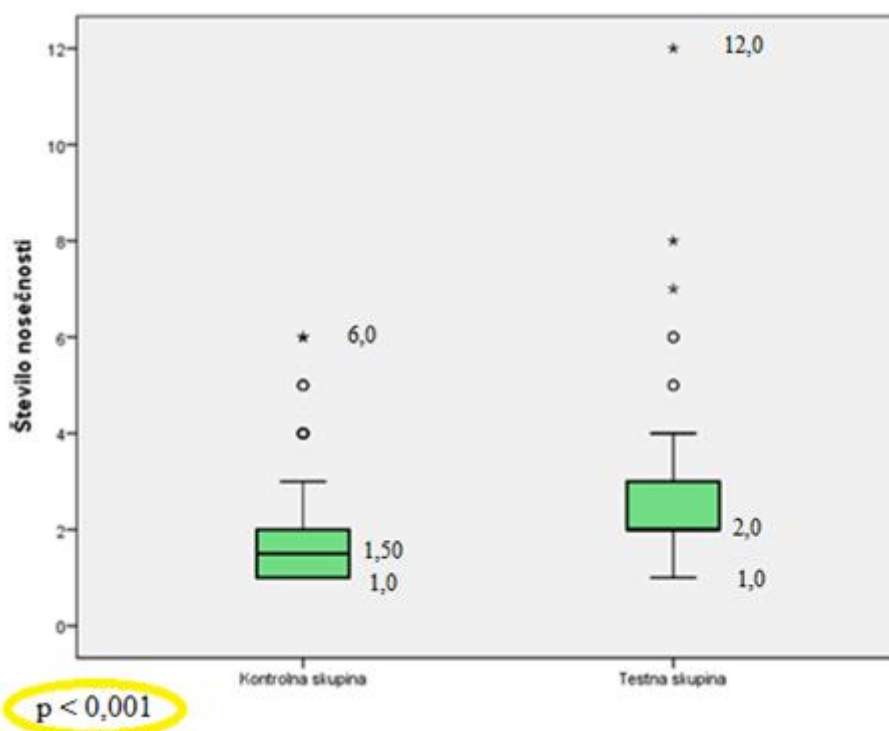
Ker so vse parametrične spremenljivke odstopale od normalne porazdelitve, smo nadalje izvedli Mann-Whitneyev U-test. Pri tem smo si postavili hipotezi H_0 in H_1 . Hipoteza H_0 trdi, da je:

- število nosečnosti,
- število živorojenih otrok,
- starost matere ob zanositvi,
- telesna višina matere,
- teža matere ob zanositvi,
- indeks telesne mase matere ob zanositvi,
- število spontanih splavov in prekinitev nosečnosti,
- količina zaužitega metionina na mesec,
- količina zaužite folne kisline na mesec

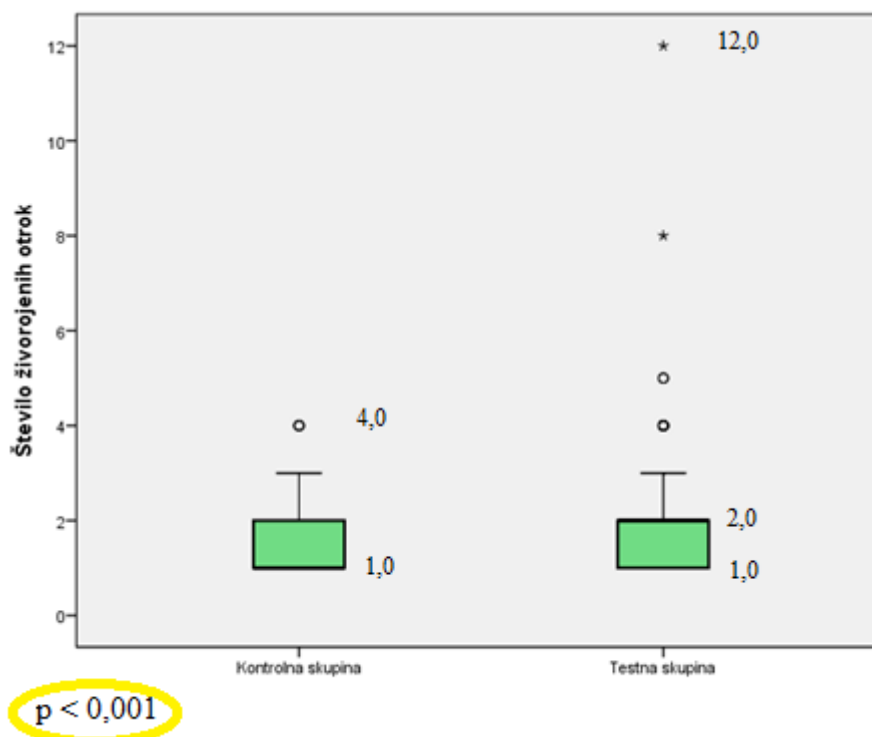
primerljiva tako v kontrolni kot tudi v testni skupini, hipoteza H_1 pa nasprotuje ničelni hipotezi. Če je bila vrednost $p < \alpha$, potem smo zavrnili ničelno hipotezo.

Število nosečnosti in živorojenih otrok

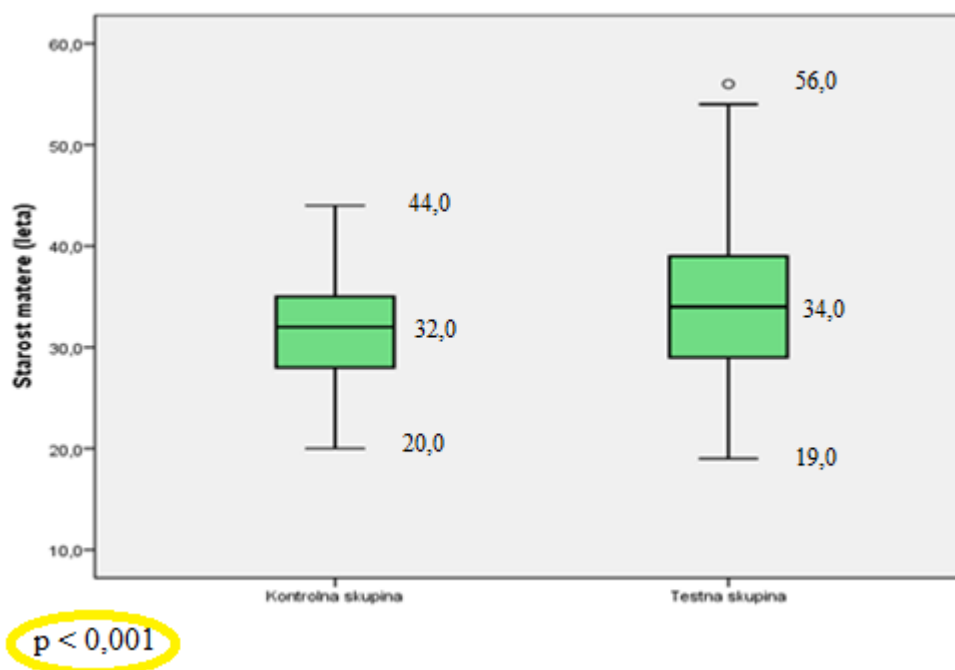
Ugotovili smo, da je število nosečnosti statistično značilno večje v TS kot v KS (Mann-Whitneyev U-test, $p < 0,001$) (slika 6). Prav tako se med skupinama razlikuje število živorojenih otrok, več jih je v TS kot v KS (Mann-Whitneyev U-test, $p < 0,001$) (slika 7). Ta vpliv ni velik, saj se mediani v KS in TS ne razlikujeta bistveno. Res pa je, da število nosečnosti in živorojenih otrok pozitivno korelira s starostjo matere. Starost mater ob vzorčenju pa je bila v TS višja kot v KS (Mann-Whitneyev U-test, $p < 0,001$) (slika 8). Omenjenih spremenljivk v povezavi s prirojenimi srčnimi napakami ni preučevala še nobena študija.



Slika 6: Kvantilni prikaz števila nosečnosti v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa



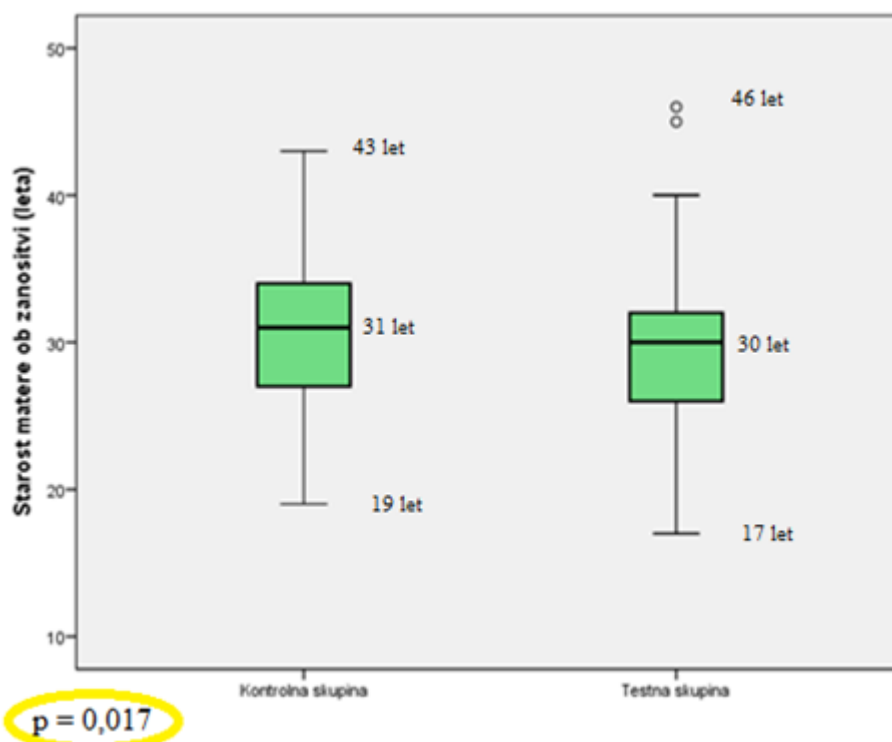
Slika 7: Kvantilni prikaz števila živorojenih otrok v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa



Slika 8: Kvantilni prikaz starosti matere ob vzorčenju v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa

Starost matere ob zanositvi

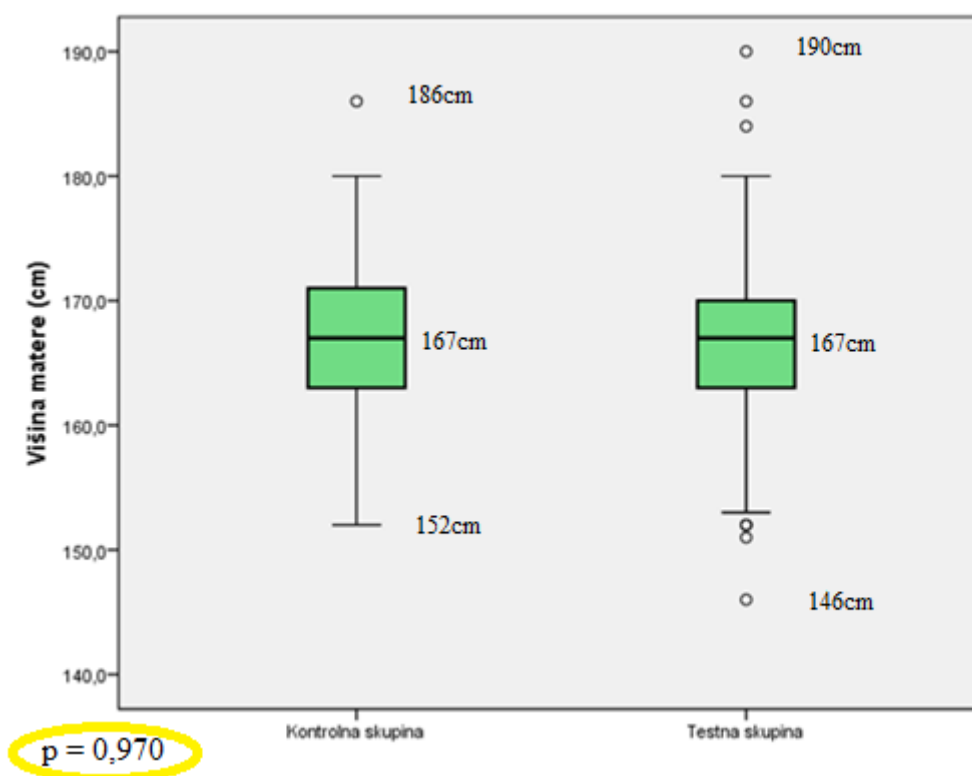
Ugotovili smo, da je starost matere ob zanositvi statistično značilno višja v KS kot v TS (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,017$) (slika 9). Kljub temu da je razlika statistično značilna, pa se med skupinama mediana razlikuje le za eno leto, zato predpostavljamo, da starost ne bi smela bistveno vplivati na tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak pri otroku. Razlog za nekoliko višjo starost mater v KS bi lahko bila v tem, da je KS vsebovala le novorojence, TS pa tudi starejše otroke (od 0 do 18 let). Znano je, da je bila nekoč povprečna starost mater nižja kot danes, kar lahko rezultira v višji starosti mater ob zanositvi v KS. Višja starost mater v KS kaže na to, da se mlade ženske, ki načrtujejo nosečnost, dandanes zanjo odločajo kasneje zaradi takšnih in drugačnih razlogov, npr. zaradi izobraževanja ali kariere. V študiji v Washingtonu so ugotovili, da med kontrolo in preiskovano skupino ni statistično značilne razlike v starosti matere ob zanositvi. V obeh skupinah je bilo največ mater starih med 20 in 35 let (43). Enako so ugotovili tudi v drugi študiji v Washingtonu (44) in v študiji na Nizozemskem (45).



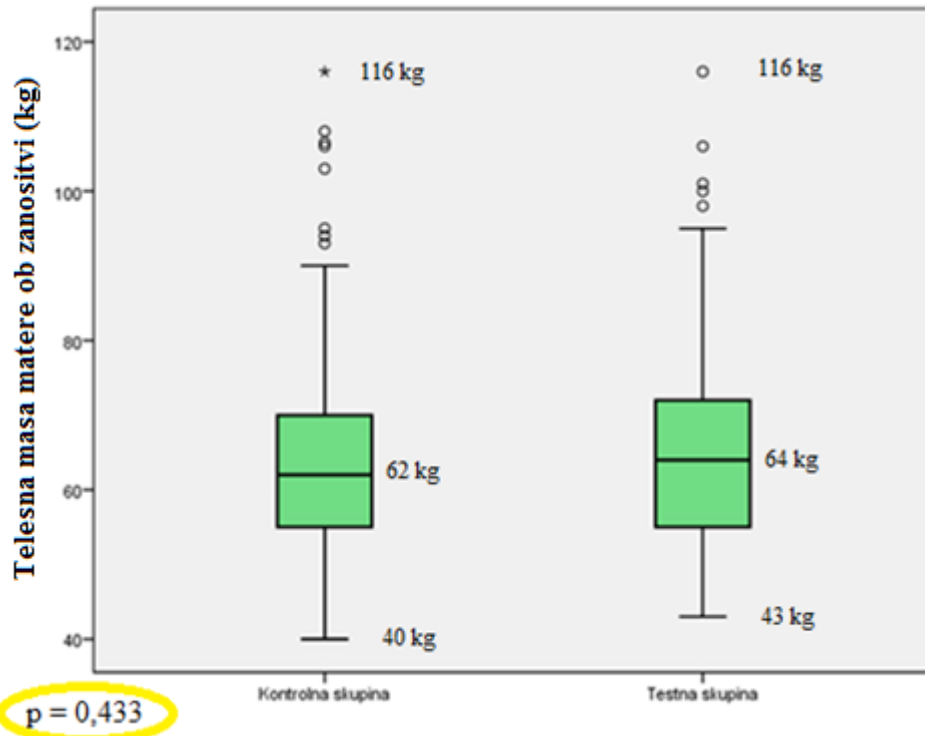
Slika 9: Kvantilni prikaz starosti mater ob zanositvi v kontrolni ($n=199$) in testni ($n=149$) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa

Telesna masa in višina matere

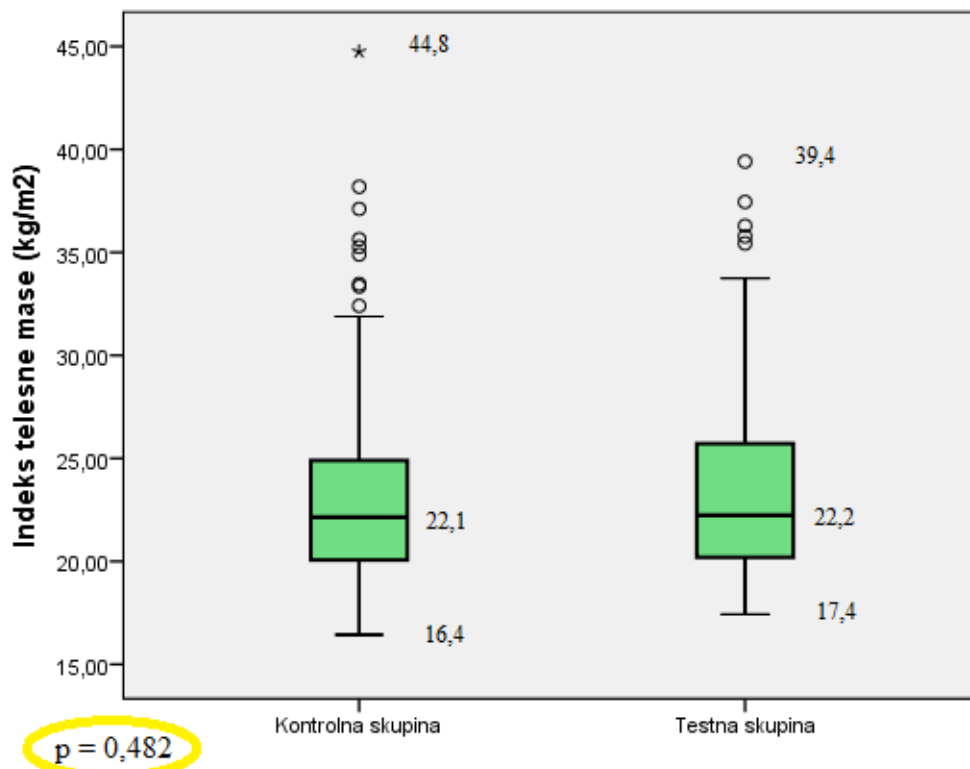
Med skupinama nismo dokazali statistično značilne razlike v teži matere ob zanositvi (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,433$) (slika 11) in telesni višini matere (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,970$) (slika 10). Telesna višina in masa matere sami po sebi ne povesta veliko, zato smo izračunali tudi indeks telesne mase in ga primerjali med KS in TS. Indeks telesne mase je bil v obeh skupinah normalen in se med KS in TS ne razlikuje (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,482$) (slika 12). Prekomerno telesno maso povezujejo z zapleti v nosečnosti in večjim tveganjem za razvoj prirojenih napak, in sicer spine bifide in orofacialne shize. Ali telesna masa matere ob zanositvi vpliva tudi na tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak sta raziskovala tudi Watkins in Botto v študiji v Atlanti. Ugotovila sta, da so matere s prekomerno telesno težo imele večje tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak pri otroku (46). Statistično značilne razlike med preiskovano in kontrolno skupino v indeksu telesne mase pa tako kot mi niso dokazali v študiji v Washingtonu. Največ mater v kontrolni in preiskovani skupini je bilo z normalno telesno težo (43).



Slika 10: Kvantilni prikaz telesne višine mater v kontrolni ($n=199$) in testni ($n=149$) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa



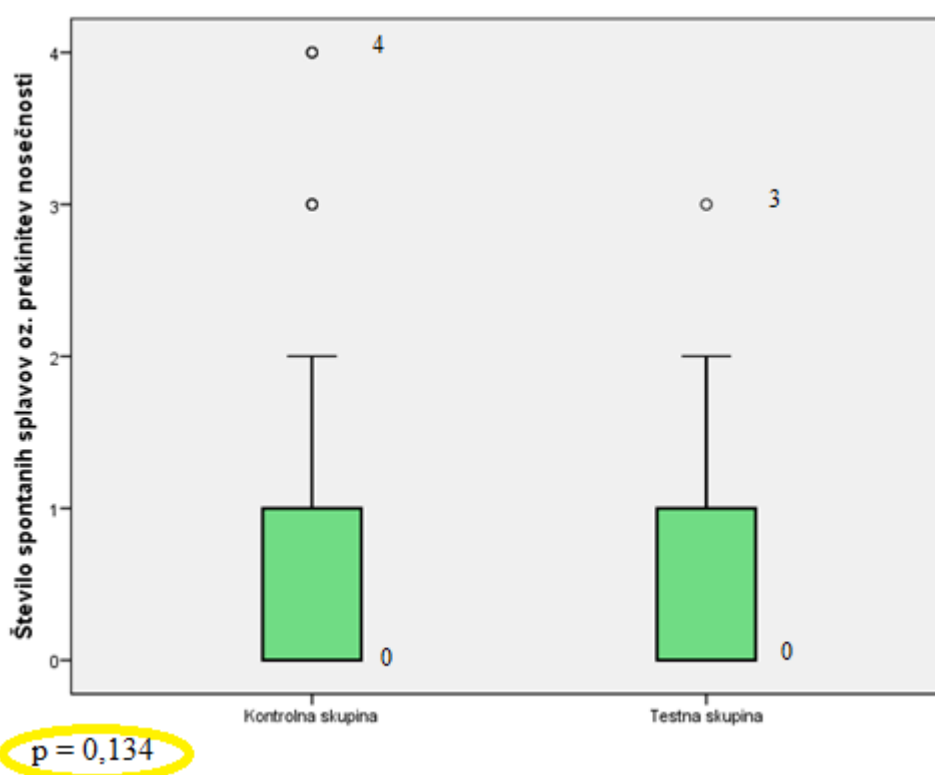
Slika 11: Kvantilni prikaz telesne mase matere ob zanositvi v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa



Slika 12: Kvantilni prikaz indeksa telesne mase matere ob zanositvi v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa

Prekinitve nosečnosti

Ugotavljali smo tudi razlike v številu ali prekinitvah nosečnosti med KS in TS. Nismo ugotovili statistično značilne razlike med skupinama v številu spontanah splavov ali spodbujenih prekinitvah nosečnosti (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,134$) (slika 13). Mediana je v KS in TS enaka 0. Tako kot mi tudi v študiji v Washingtonu niso ugotovili razlike med skupinama v zgodovini splavov in prekinitvah nosečnosti (44). V nasprotju z našimi ugotovitvami sta Shi in Yang s sodelavci v svoji raziskavi ugotovila, da je več splavov in prekinitvah nosečnosti prisotnih pri ženskah, ki so rodile otroka s prirojeno srčno napako (24). To bi lahko kazalo na genetsko komponento tovrstnih okvar.

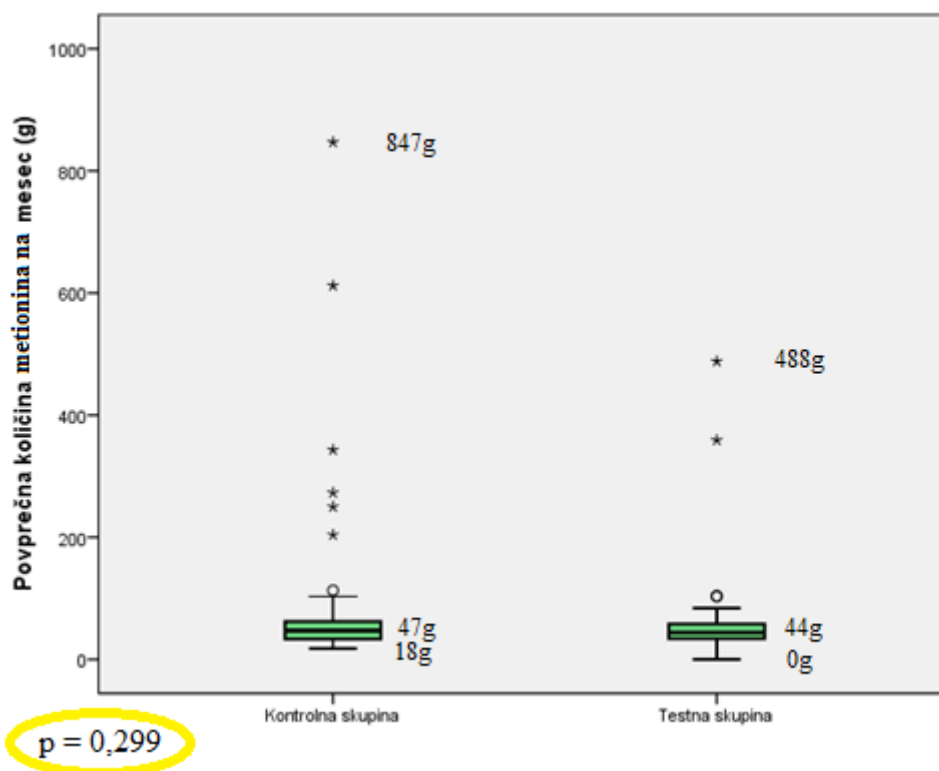


Slika 13: Kvantilni prikaz števila spontanah splavov oz. prekinitvah nosečnosti v kontrolni ($n=199$) in testni ($n=149$) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa

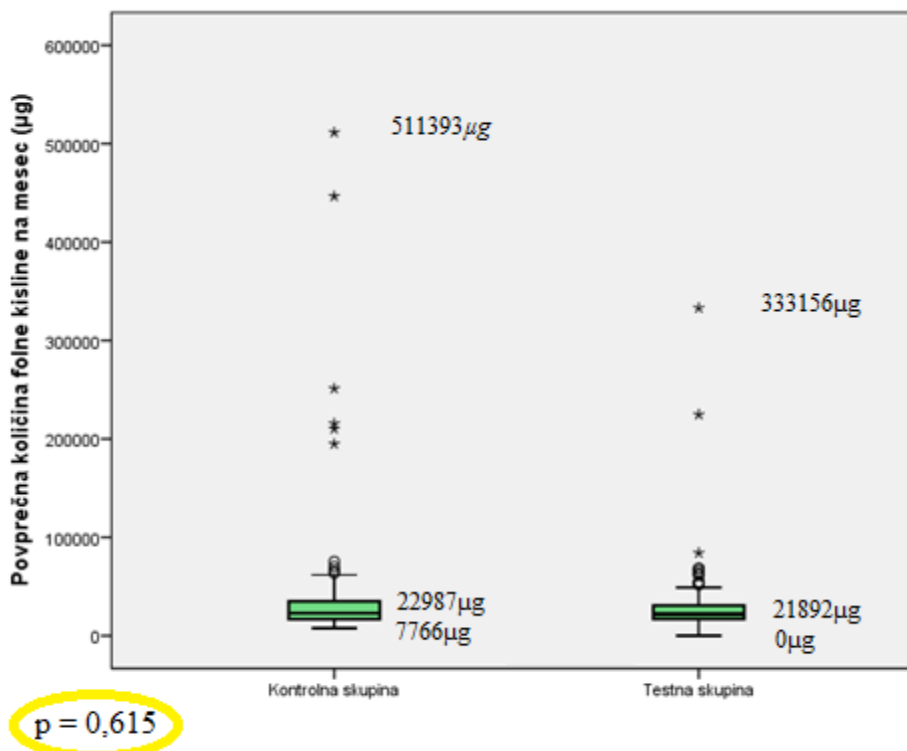
Vnos metionina in folne kisline s hrano

Statistično značilne razlike med skupinama nismo ugotovili niti v ocenjeni količini zaužitega metionina (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,299$) in folne kisline (Mann-Whitneyev U-test, $p = 0,615$) na mesec (sliki 14 in 15). Kot je bilo povedano v uvodu, ima metionin pomembno vlogo v različnih metilacijskih reakcijah (10,11). Nismo zasledili nobene študije, ki bi ocenjevala vpliv količine zaužitega metionina na tveganje za razvoj

prirojenih srčnih napak. Shaw s sodelavci pa je ocenil ta vpliv na tveganje za pojav druge prirojene napake, in sicer več zaužitega metionina s hrano naj bi zmanjšalo tveganje za razvoj orofacialne shize pri plodu (47). Količina metionina pa ni odvisna samo od zaužitja s hrano, nanjo vpliva tudi količina zaužitih folatov in folne kisline. Aktivna oblika folatov, 5-metilTHF, daruje metilno skupino v reakciji remetilacije homocisteina v metionin (10). V študiji na Nizozemskem so ugotovili, da prehrana vpliva na tveganje za pojav prirojenih srčnih napak. Prehrana, ki vsebuje veliko donorjev skupine z enim ogljikovim atomom, rezultira v višjem nivoju folatov v krvi (48). V študiji v Kanadi so ugotovili, da se je po uveljavitvi polnozrnatih izdelkov s folno kislino občutno zmanjšala prevalenca prirojenih srčnih napak (9). Hrana z veliko folne kisline je še posebej pomembna pri nenačrtovanih nosečnostih. Tako kot v študiji v Kanadi so tudi v ZDA ugotovili, da se je po uveljavitvi polnozrnatih izdelkov s folno kislino občutno zmanjšala prevalenca prirojenih bolezni, sicer ni podatka za prirojene srčne napake, ampak za orofacialne shize (10). Kljub temu da nismo zaznali statistično značilne razlike med KS in TS v vnosu folatov in metionina, pa so minimalne in maksimalne vrednosti vnesenega metionina in folne kisline v TS opazno nižje kot v KS (sliki 14 in 15).



Slika 14: Kvantilni prikaz povprečnih količin Metionina na mesec v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa



Slika 15: Kvantilni prikaz povprečnih količin folne kisline na mesec v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa

4.1.2 ANALIZA KATEGORIČNIH SPREMENLJIVK

Analizirali smo tudi povezanost nekaterih okoljskih dejavnikov, ki so nastopali v obliki kategoričnih spremenljivk, s pojavnostjo prirojjenih srčnih napak. Ti dejavniki so prisotnost sladkorne bolezni ob zanositvi, gestacijski diabetes, prisotnost drugih kroničnih bolezni pri materi, jemanje protiepileptičnih in drugih zdravil v času nosečnosti, povišana telesna temperatura v prvem trimestru nosečnosti, jemanje folatnih pripravkov in drugih prehranskih dodatkov v času nosečnosti, časovni okvir jemanja folatov, sodelovalnost jemanja folatnih pripravkov, status kajenja matere in kajenje v nosečnosti, družinska anamneza prirojjenih napak in tip prirojene napake, izobrazba matere in spol otroka. V vsaki kategoriji smo izračunali frekvence za KS in TS ter nato izvedli neparametrični Chi-kvadrat test. Med sabo smo primerjali kategorične spremenljivke dveh neodvisnih vzorcev, torej v KS in v TS. Dobljene podatke smo uredili v kontingenčne tabele, kot je na primer 2x2 ali 2x3 kontigenčna tabela. Pri tem smo si postavili dve hipotezi:

- H_0 – Med skupinama ni statistično značilne razlike v frekvencah.
- H_1 – Med skupinama obstaja statistično značilna razlika v frekvencah.

Opazovali smo vrednost Pearsonovega Chi-kvadrat koeficienta oziroma vrednost p in jo primerjali s stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Če smo dobili vrednost p manjšo od stopnje tveganja α , potem smo zavrnilo H_0 in sklepali, da obstaja statistično značilna razlika med KS in TS. Rezultati Chi-kvadrat testa so prikazani v preglednici V.

Preglednica V: Rezultati Chi-kvadrat testa. Primerjava frekvenc kategoričnih spremenljivk med kontrolno in testno skupino

Spremenljivka	Izid	KS n (%)	TS n (%)	p*
Sladkorna bolezen ob zanositvi	Da	0 (0)	0 (0)	/
	Ne	199 (100)	150 (100)	
Gestacijski diabetes	Da	28 (14,1)	16 (10,7)	0,343
	Ne	171 (85,9)	134 (89,3)	
Prisotnost drugih kroničnih boleznih pri materi	Da	15 (7,5)	27 (18,0)	0,003
	Ne	184 (92,5)	123 (82,0)	
Protiepileptična zdravila v času nosečnosti	Da	1 (0,5)	1 (0,7)	0,841
	Ne	198 (99,5)	149 (99,3)	
Jemanje drugih zdravil v času nosečnosti	Da	93 (46,7)	80 (53,3)	0,222
	Ne	106 (53,3)	70 (46,7)	
Vročina > 38°C v prvem trimestru nosečnosti	Da	12 (6,0)	7 (4,7)	0,578
	Ne	187 (94,0)	143 (95,3)	
Jemanje folatnih pripravkov pred zanositvijo	Da	78 (39,2)	40 (26,7)	0,014
	Ne	121 (60,8)	110 (73,3)	
Oblika folatov (pred zanositvijo)	Folna kislina	60 (88,2)	33 (89,2)	0,833
	Metafolin	8 (11,8)	4 (10,8)	
Jemanje folatnih pripravkov v prvem trimestru	Da	180 (90,5)	111 (74,0)	<0,001
	Ne	19 (9,5)	39 (26,0)	
Oblika folatov (prvi trimesster)	Folna kislina	134 (88,2)	87 (92,6)	0,268
	Metafolin	18 (11,8)	7 (7,4)	
Časovni okvir jemanja pripravkov s folati (začetek jemanja)	Prej kot 3 tedne po zanositvi	114 (58,8)	65 (43,6)	<0,001
	Kasneje kot 3 tedne po zanositvi	62 (32,0)	45 (30,2)	
	Brez dodatnega vnosa folatov v nosečnosti	18 (9,3)	39 (26,2)	
Sodelovalnost pri jemanju folatov	Visoka	136 (75,6)	98 (89,1)	0,016
	Srednja	43 (23,9)	12 (10,9)	

	Nizka	1 (0,6)	0 (0,0)	
Jemanje drugih prehranskih dopolnil	Nič	158 (79,4)	109 (72,7)	0,002
	Multivitamini	21 (10,6)	11 (7,3)	
	Minerali (Ca, Mg...)	12 (6,0)	27 (18,0)	
	Omega 3	6 (3,0)	0 (0,0)	
	Drugi	2 (1,0)	3 (2,0)	
Status kajenja matere	Kadilka	23 (11,6)	31 (20,7)	0,043
	Bivša kadilka	64 (32,2)	37 (24,7)	
	Nekadilka	112 (56,3)	82 (54,7)	
Kajenje v nosečnosti	Da	22 (11,1)	19 (13,1)	0,574
	Ne	176 (88,9)	126 (86,9)	
Izobrazba matere	Osnovna šola	3 (1,5)	11 (7,3)	<0,001
	Poklicna šola	62 (31,2)	70 (46,7)	
	Srednja šola, Gimnazija	12 (6,0)	8 (5,3)	
	Višja šola	24 (12,1)	20 (13,3)	
	Univerza	83 (41,7)	36 (24,0)	
	Magisterij, doktorat	15 (7,5)	5 (3,3)	
Prisotna pozitivna družinska anamneza	Da	8 (4,0)	33 (22,0)	<0,001
	Ne	191 (96,0)	117 (78,0)	
Spol otroka	Deček	113 (56,8)	87 (58,8)	0,820
	Deklica	86 (43,2)	63 (42,0)	

*Chi-kvadrat test

Kronične bolezni in sladkorna bolezen

Kronične bolezni lahko vplivajo na potek nosečnosti in na normalen plodov razvoj. Sladkorna bolezen, ki je pri materi prisotna že pred zanositvijo in gestacijski diabetes, predvsem neurejena hiperglikemija, lahko vpliva na razvoj ploda in pojav malformacij (diabetična fetopatija) (49). Vpliv prisotnosti sladkorne bolezni ob zanositvi v naši raziskavi ne moremo oceniti, saj nobena mati ob zanositvi ni imela prisotne sladkorne bolezni, imelo pa je 28 (14,1%) mater gestacijski diabetes v KS in 16 (10,7%) v TS, vendar nam je analiza pokazala, da med skupinama ni statistično značilne razlike v prisotnosti gestacijskega diabetesa (Chi-kvadrat test, $p = 0,343$). Statistično značilna razlika (Chi-kvadrat test, $p = 0,003$) med KS in TS se je pokazala v prisotnosti drugih kroničnih bolezni. V TS je imelo kar 27 (18,0%) mater prisotno eno izmed drugih kroničnih bolezni, v KS pa 15 (7,5%).

Vpliv sladkorne bolezni je Muhammad s sodelavci ocenjeval v svoji študiji in dokazal, da je več mater, ki so imele prisotno sladkorno bolezen ob zanositvi ali pa gestacijski diabetes, rodilo otroke s prirojeno srčno napako (50). Prav tako so vpliv sladkorne bolezni ob zanositvi in nosečniške sladkorne bolezni ocenjevali v bolnišnici v Pakistanu. Ugotovili so, da le-ta lahko povzroči več malformacij, med drugimi tudi razvoj prirojenih srčnih napak (51). Do enakih zaključkov so prišli v študiji v Washingtonu, kjer so ugotovili, da med kontrolno in preiskovano skupino obstaja statistično značilna razlika v frekvenci sladkorne bolezni v nosečnosti. Več mater v preiskovani skupini je imelo prisotno sladkorno bolezen v nosečnosti (43). Prav tako je Sullivan s sodelavci ugotovil, da je v preiskovani skupini več mater, ki so imele sladkorno bolezen ob zanositvi in gestacijski diabetes (44).

Protiepileptična zdravila

Številna protiepileptična zdravila delujejo teratogeno in vplivajo na povečano tveganje za pojav prirojenih napak pri plodu. Prav zato je priporočljivo pri ženskah, ki so na protiepileptični terapiji, načrtovanje nosečnosti in sočasno jemanje pripravkov s folno kislino (52). Med KS in TS se ni pokazala statistično značilna razlika v jemanju protiepileptičnih zdravil (Chi-kvadrat test, $p = 0,841$) in drugih zdravil (Chi-kvadrat test, $p = 0,222$) v času nosečnosti. V vsaki skupini je po ena mati jemala protiepileptična zdravila, druga zdravila je v KS jemalo 93 (46,7%) mater, v TS pa 80 (53,3%). V študiji na Kitajskem, kjer je prirojena srčna napaka ena izmed najpogostejših prirojenih napak, sta Shi in Yang s sodelavci v otroški bolnišnici Nanjing ocenjevala izpostavljenost nekaterim zdravilom, kot so zdravila za zniževanje telesne temperature, prehlad, gripa in druge, predvsem v prvem trimestru. Njihovi izsledki nasprotujejo našim, ugotovili so, da izpostavljenost matere zdravilom v prvem trimestru lahko vpliva na tveganje za pojav prirojene srčne napake pri plodu (24). Da bi ocenili vpliv protiepileptičnih in drugih zdravil na pojavnost prirojenih srčnih napak pri plodu, bi morali v naši študiji jemanje teh zdravil oceniti na večji populaciji. V študiji v Indiji so ugotovili, da sicer prisotnost epilepsije ne vpliva na tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak pri otroku, uporaba protiepileptičnih zdravil, predvsem kombinacija več protiepileptičnih zdravil, v času nosečnosti pa na to tveganje lahko vpliva (52).

Povišana telesna temperatura pri materi

Nekatere študije nakazujejo, da povišana telesna temperatura pri materi, predvsem v prvem trimestru nosečnosti, vpliva na pojav prirojenih napak, kot so prirojene srčne napake. Pri povišani telesni temperaturi vsi procesi potekajo hitreje, lahko se poveča presnova, pospeši delitev celic, kar bi lahko vplivalo na razvoj organov pri plodu (43). V naši raziskavi nismo ugotovili statistično značilne razlike med KS in TS v prisotnosti povišane telesne temperature v prvem trimestru (Chi-kvadrat test, $p = 0,578$). Vročino oziroma povišano telesno temperaturo nad 38°C je imelo 12 (6,0%) mater v KS in 7 (4,7%) mater v TS. Naše ugotovitve nasprotujejo raziskavi, ki so jo izvedli v Washingtonu, kjer so ugotavljali vpliv povišane telesne temperature na tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak. V študiji so namreč dokazali, da obstaja statistično značilna razlika v prisotnosti vročine $>38^{\circ}\text{C}$ ali gripe pred zanositvijo in v prvem trimesečju nosečnosti ter pojavnostjo specifičnih prirojenih srčnih napak (malformacije desne strani srca) (43).

Vnos folatnih pripravkov in sodelovalnost pri jemanju folatnih pripravkov

Naslednji analiziran okoljski dejavnik je vnos folatov s folatnimi pripravki pred zanositvijo in v času nosečnosti. Le-ti so pomembni za razvoj ploda, saj med drugim sodelujejo pri sintezi nukleinskih kislin ter remetilaciji homocisteina v metionin in tako zmanjšujejo toksičen učinek homocisteina (9). Pred zanositvijo je pričakovano več mater v KS kot v TS jemalo pripravke s folati. V KS jih je te pripravke jemalo 78 (39,2%), v TS pa 40 (26,7%). Lahko rečemo, da je pri zmanjševanju tveganja za nastanek prirojenih srčnih napak pomembno načrtovanje nosečnosti. Če ženska ne načrtuje nosečnosti, ne jemlje folatnih pripravkov in drugih vitaminov v obliki prehranskih dopolnil že pred samo zanositvijo, ne more izkoristiti prednosti uporabe le-teh. Zanimalo nas je tudi kakšen tip folatov so jemale pred zanositvijo, in sicer ali je bila to folna kislina ali pa metafolin, ki je aktivna in bolj učinkovita oblika folatov. Med materami, ki so jemale folate že pred zanositvijo, jih je v KS 60 (88,2%) jemalo folno kislino, v TS pa 33 (89,2%). Metafolin je jemalo 8 mater (11,8%) v KS in 4 (10,8%) v TS. V KS je torej statistično značilno več mater jemalo folatne pripravke že pred nosečnostjo ($p = 0,014$), nismo pa ugotovili statistično značilne razlike med skupinama (Chi-kvadrat test, $p = 0,883$) v tipu folatov, torej uporabi folne kisline ali pa metafolina.

Ker so folati med drugim pomembni za normalen razvoj srca pri plodu, predvsem v prvih tednih nosečnosti oziroma v prvem trimesečju, nas je zanimalo tudi, kdaj so matere, če

sploh, pričele z jemanjem folatnih pripravkov. Oblikovali smo tri skupine, in sicer skupino v kateri so matere pričele z uporabo folatov že prej kot tri tedne po zanositvi, skupino v kateri so matere pričele z uporabo folatov kasneje kot 3 tedne po zanositvi in skupino v kateri matere sploh niso jemale folatnih pripravkov. Analiza je pokazala, da obstaja statistična razlika (Chi-kvadrat test, $p < 0,001$) med KS in TS v časovnem okvirju pričetka jemanja folatov. V KS je 114 (58,8%) mater začelo z uporabo folatnih pripravkov prej kot tri tedne po zanositvi, 62 (32,0%) jih je začelo z uporabo kasneje kot tri tedne po zanositvi, 18 (9,3%) pa jih folatnih pripravkov sploh ni uporabljalo. V nasprotju s KS, v TS folatnih pripravkov ni uporabljalo kar 39 (26,2%) mater, 45 (30,2%) mater je pričelo z jemanjem le-teh kasneje kot 3 tedne po zanositvi, 65 (43,6%) pa je z uporabo folatnih pripravkov začelo že prej kot tri tedne po zanositvi. Lahko rečemo, da je pomembno jemanje pripravkov s folati v prvem trimestru, pričakovano jih je več mater jemalo v KS kot v TS. Poleg tega so matere v KS v povprečju začele z jemanjem folatov bolj zgodaj kot v TS. Statistično značilne razlike med skupinama (Chi-kvadrat test, $p = 0,268$) zopet nismo ugotovili v obliki folatov, apliciranih v prvem trimestru nosečnosti. Aktivno obliko folatov metafolin je jemalo v KS 18 (11,8%) mater, v TS pa 7 (7,4%). Shi in Yang s sodelavci sta, podobno kot mi, v svoji študiji ugotovila, da je v preiskovani skupini zelo malo mater jemalo folate v obdobju pred zanositvijo. Tudi po odkritju nosečnosti niti polovica mater v preiskovani skupini ni jemala folatov v prvem trimestru, kar kaže na morebitno večje tveganje za pojav prirojenih srčnih napak (24). Tudi v meta analizi na Kitajskem so prišli do zaključka, da uporaba folatnih pripravkov zmanjša tveganje za pojav prirojenih srčnih napak (25). Naše ugotovitve se ne ujemajo z ugotovitvami, ki jih je v svoji raziskavi v Kanadi pridobil Rozen s sodelavci. Delež mater, ki so jemale folate že pred zanositvijo, je bil namreč v preiskovani skupini večji, vendar so to težko ocenili zaradi nepopolno izpolnjenega vprašalnika (9). Prav tako niso niti v študiji v Indiji niti na Nizozemskem ugotovili statistično značilne razlike v uporabi folatnih pripravkov med preiskovano in kontrolno skupino (23,52).

Preverili smo tudi samo sodelovalnost pri jemanju folatov oziroma rednost jemanja folatnih pripravkov. Pokazala se je statistično značilna razlika med skupinama (Chi-kvadrat test, $p = 0,016$) v sodelovalnosti. Matere v KS in TS smo razdelili v tri podskupine, in sicer v tiste z visoko, srednjo in nizko rednostjo jemanja folatnih pripravkov. Nepričakovano so matere v TS bolj redno jemale folatne pripravke v primerjavi z materami v KS. Sodelovalnost jemanja je bila v KS visoka pri 136 (75,6%) materah, pri 43

(23,9%) materah srednja in pri 1 (0,6%) materi nizka. V TS ni bilo nobene matere z nizko sodelovalnostjo jemanja folatnih pripravkov, bilo pa je 12 (10,9%) mater s srednjo in 98 (89,1%) z visoko. Študije, ki bi preučevale sodelovalnost oziroma samo rednost jemanja folatnih pripravkov nismo zasledili.

Vnos drugih prehranskih dopolnil

V času nosečnosti so pomembna tudi druga prehranska dopolnila, kot so multivitamini, omega 3 maščobne kisline, minerali in drugi. V jemanju drugih prehranskih dopolnil se je prav tako pokazala statistična razlika med TS in KS (Chi-kvadrat test, $p = 0,002$). V KS drugih prehranskih dodatkov ni jemalo 158 (79,4%) mater, v TS pa 109 (72,7%). Več mater je jemalo multivitamine v KS, in sicer 21 (10,6%) mater, v TS pa 11 (7,3%). Minerale, kot sta kalcij in magnezij, je v KS jemalo 12 (6,0%) mater, v TS pa presenetljivo več, kar 27 (18,0%) mater. V TS nobena mati ni jemala omega 3 maščobnih kislin, v KS pa je omega 3 jemalo 6 (3,0%) mater. Sklepali bi lahko, da minerali, kot sta kalcij in magnezij, vplivajo na razvoj srca pri plodu, vendar na tem področju še ni nobene raziskave. V tem primeru bi šlo lahko za slučajen pojav, so pa potrebne dodatne študije, ki bi to trditev lahko potrdile ali ovrgle. Vpliv jemanja multivitaminov so preučevali tudi v Atlanti in na Madžarskem. Do podobnih ugotovitev kot mi je prišel Botto s sodelavci v študiji v Atlanti, saj so matere, ki so jemale multivitamine že pred zanositvijo, imele statistično značilno manjše tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak pri plodu (53). Enako so ugotovili v študiji na Madžarskem (10). V študiji v Kanadi pa Rozen s sodelavci ni našel statistično značilne razlike v jemanju multivitaminov v času nosečnosti (9).

Kajenje

Pomemben je status kajenja v času nosečnosti, saj kajenje povezujejo z več prirojenimi anomalijami. Plod dobi vse hranilne snovi in kisik iz krvnega obtoka matere, cigaretni dim pa vsebuje ogromno toksičnih kemikalij, ki so ob kajenju prisotne v krvnem obtoku matere. Obstaja več mehanizmov, ki motijo razvoj srca in ožilja pri plodu. Nikotin in ogljikov monoksid v cigaretnem dimu prehajata v placento, tvori pa se tudi karboksihemoglobin, kar ovira prenos kisika v placento in povzroča hipoksijo. Le-ta lahko vpliva na razvoj ploda (44). Tako smo preverili tudi status kajenja pri materah in kajenje v nosečnosti. Matere smo razdelili v tri kategorije, in sicer v kadilke, nekadilke in bivše kadilke. Z analizo smo ugotovili statistično značilno razliko (Chi-kvadrat test, $p = 0,043$)

med skupinama. V KS je več nekadilk, in sicer 112 (56,3%), v TS pa je nekadilk 82 (54,7%). Manj je kadilk v KS, 23 (11,6%), v TS pa 31 (20,7%). Bivših kadilk je v KS 64 (32,2%), v TS pa 37 (24,7%). V KS je v času nosečnosti kadilo 22 (11,1%) mater, v TS pa 19 (13,1%), kar ne predstavlja statistično značilne razlike (Chi-kvadrat test, $p = 0,547$). Pri tem se moramo zavedati tudi dejstva, da odgovori tu morda niso bili iskreni. Pojavi se nam vprašanje, če so matere na to vprašanje odgovorile odkrito, saj jih je morda sram povedati, da so kadile v času nosečnosti. Kajenje v času nosečnosti so preučevali tudi v študiji v Washingtonu. Ugotovili so, da je več mater v preiskovani skupini kadilo med nosečnostjo oziroma v prvem trimestrju nosečnosti. Večja pa je bila tudi prevalenca prirojenih srčnih napak pri materah, ki so kadile v času nosečnosti in so zanosile pri 35 letih ali več, v primerjavi z mlajšimi materami (44).

Izobrazba matere

Statistično značilna razlika med skupinama (Chi-kvadrat test, $p < 0,001$) se je pokazala tudi v izobrazbi matere. Ugotovili smo, da imajo matere v KS višjo izobrazbo kot tiste v TS (preglednica V). Izobrazba bi lahko vplivala na vedenje o tem, kaj plod potrebuje za normalen razvoj in tudi zavedanje o pomembnosti načrtovanja nosečnosti in jemanja folatov in drugih prehranskih dopolnil pred nosečnostjo in v času nosečnosti za preprečevanje številnih prirojenih napak ploda. Do podobnih ugotovitev sta v svoji študiji na Kitajskem prišla tudi Shi in Yang s sodelavci. Prišli so do zaključka, da je v skupini, kjer imajo matere nižjo izobrazbo večja prevalenca prirojenih srčnih napak pri otroku (24). V študiji primerov in kontrol na Nizozemskem so tako kot mi ugotovili, da je v preiskovani skupini več mater z nižjo stopnjo izobrazbe kot v kontrolni skupini (45). V nasprotju z našimi rezultati pa so rezultati, do katerih so prišli v študijah v Washingtonu in na Nizozemskem, kjer med preiskovano in kontrolno skupino niso našli statistično značilne razlike v izobrazbi matere (23,44).

Pozitivna družinska anamneza

Za najpomembnejši dejavnik tveganja se je izkazala prisotnost pozitivne družinske anamneze, torej prisotnost prirojenih napak v družini oziroma pri sorodnikih. Pozitivna družinska anamneza je pričakovano statistično značilno (Chi-kvadrat test, $p < 0,001$) bolj prisotna v TS kot v KS. 8 (4,0%) mater v KS je odgovorilo pozitivno na prisotnost družinske anamneze prirojenih napak, v TS pa je pozitivno odgovorilo kar 33 (22,0%)

mater. Prirojena napaka se je v KS pojavila v vseh primerih pozitivne anamneze le pri enem sorodniku, v TS pa se pri enem sorodniku pojavi pri 25 (75,8%) materah, pri 8 (24,2%) materah pa je v družini več kot en sorodnik s prirojeno srčno napako ($p = 0,121$). Prisotnost prirojenih napak v družini s pozitivno anamnezo smo opredelili tudi glede na tip napake ($p = 0,332$). Tako v KS kot tudi v TS je v družinah s pozitivno anamnezo prisotna orofacialna shiza, in sicer v KS v 2 (25,0%) in v TS v 2 (6,1%) primerih. Prirojeno srčno napako ima v KS 5 (62,5%) prizadetih sorodnikov, v TS pa kar 27 (81,8%). Napaka nevralne cevi se je v TS pojavila pri 1 (3,0%) prizadetem sorodniku, druge prirojene anomalije pa ima v KS in TS po 1 prizadet sorodnik (12,5% in 3,0%). V TS imata več napak hkrati 2 prizadeta sorodnika (6,1%).

Na splošno lahko rečemo, da prirojene napake pri sorodnikih otrok v TS kažejo večjo stopnjo heterogenosti in so pojavnosti v primerjavi s KS. Statistično značilen vpliv prisotne pozitivne družinske anamneze na tveganje za nastanek prirojenih srčnih napak pri otroku sta v svoji študiji dokazala tudi Shi in Yang s sodelavci (24). Prav tako so do enakih ugotovitev prišli v študiji na Nizozemskem (45)

Spol otroka

Preverili smo vpliv spola otroka na pojavnost prirojenih srčnih napak, vendar nismo uspeli dokazati statistično značilnega vpliva (Chi-kvadrat test, $p = 0,820$). V KS je bilo 113 (56,8%) dečkov in 86 (43,2%) deklic, v TS pa 87 (58,0%) dečkov in 63 (42,0%) deklic. Vpliv spola so ugotavljali že v več študijah. Prišli so do različnih ugotovitev. Na Kitajskem sta Shi in Yang s sodelavci v otroški bolnišnici Nanjing izvedla študijo, v kateri so dokazali, da spol otroka vpliva na tveganje za razvoj prirojene srčne napake, in sicer je tveganje večje pri deklicah (24). Do enakih zaključkov je prišel tudi Rozen s sodelavci (9). V študijah na Kitajskem (14) in v Washingtonu (44) pa niso odkrili statistično značilne razlike v spolu otroka med preiskovano in testno skupino, kar je skladno z našimi ugotovitvami.

4.2 Analiza rezultatov genotipizacije

Po genotipizaciji s TaqMan sondami smo genotipe razvrstili v kategorije ter določili frekvence v vsaki kategoriji. Izračunali smo frekvence genotipov mater in njihovih otrok tako v KS kot tudi v TS. Genotipe encimov MTHFR, MTHFD1 in MTRR smo razdelili v kategoriji divji tip in mutiran genotip z vsaj enim mutiranim alelom. MTHFR genotipe pa

smo razdelili še v kategoriji genotipi z več kot 60% aktivnostjo encima in genotipi z manj kot 60% aktivnostjo encima. Oblikovali smo si 2x2 kontingenčno tabelo in izvedli Chi-kvadrat test. Postavili smo si hipotezi: H_0 , ki trdi, da se dobljene frekvence izbranih kategorij med KS in TS ne razlikujejo, ter H_1 , ki pravi, da se te frekvence med KS in TS razlikujejo. Preverili smo vrednost Pearsonovega Chi-kvadrat koeficienta, vrednost p, in jo primerjali s stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Vrednost p manjša od stopnje tveganja α pomeni statistično značilno različno porazdelitev genotipov v KS in TS. Rezultati Chi-kvadrat testa so prikazani v spodnji preglednici VI.

Preglednica VI: Rezultati genotipizacije - Chi-kvadrat test

ENCIM	GENOTIP	Materi n (%)		Otroci n (%)	
		KS	TS	KS	TS
MTHFR	divji tip	30 (15,1)	17 (11,4)	16 (8,0)	18 (12,1)
	vsaj 1 mutiran alel	169 (84,9)	132 (88,6)	183 (92,0)	131 (87,9)
		p* = 0,322		p* = 0,209	
MTHFR	aktivnost >60%	138 (69,3)	98 (65,8)	144 (72,4)	110 (73,8)
	aktivnost <60%	61 (30,7)	51 (34,2)	55 (27,6)	39 (26,2)
		p* = 0,480		p* = 0,761	
MTHFD1	GG	68 (34,2)	52 (34,9)	55 (27,6)	56 (37,6)
	AA in AG	131 (65,8)	97 (65,1)	144 (72,4)	93 (62,4)
		p* = 0,887		p* = 0,049	
MTRR	AA	32 (16,1)	28 (18,8)	30 (15,1)	31 (20,9)
	GG in AG	167 (83,9)	121 (81,2)	169 (84,9)	117 (79,1)
		p* = 0,508		p* = 0,155	

*Chi-kvadrat test

Preverili smo tudi ali so opazovane frekvence analiziranih genotipov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. V ta namen smo uporabili Fisherjev natančni test. Ker je predpogoj za izvedbo tega testa neodvisnost vzorcev, smo izbrali štiri populacije, in sicer KS mater, TS mater, KS otrok in TS otrok. Opazovali smo vrednost p in jo primerjali s stopnjo tveganja $\alpha = 0,05$. Če je vrednost p večja od 0,05 pomeni, da je vzorčna populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. V naši raziskavi so bile vse vrednosti p večje od 0,05, zato lahko sklepamo, da smo za raziskavo izbrali primeren vzorec.

4.2.1 MTHFR rs1801133, rs1801131

Genotipe encima MTHFR smo najprej razdelili v dve kategoriji, v kategorijo z genotipom divjega tipa in v kategorijo, kjer je v kombinaciji dveh genotipov rs1801133 in rs1801131 prisoten vsaj en mutiran alel. Nismo uspeli dokazati statistično značilne razlike med KS in TS v frekvencah genotipov MTHFR mater (Chi-kvadrat test, $p = 0,332$) in njihovih otrok (Chi-kvadrat test, $p = 0,209$) (preglednica VI). Nato smo za isti gen oblikovali drugačne kategorije. Prva kategorija zajema genotipe s predvideno aktivnostjo encima MTHFR večjo od 60% in druga genotipe z aktivnostjo manjšo od 60%. Med KS in TS zopet nismo uspeli dokazati statistično značilne razlike v prisotnosti posameznega genotipa, oziroma v aktivnosti encima MTHFR pri materah (Chi-kvadrat test, $p = 0,480$) in otrocih (Chi-kvadrat test, $p = 0,761$) (preglednica VI).

Sklepamo lahko, da genotipa encima MTHFR rs1801133 in rs1801131 ne vplivata na pojavnost prirojene srčne napake pri otrocih v slovenski populaciji. Vpliv tega polimorfizma so raziskovali v številnih študijah. Rezultati le-teh pa si med seboj pogosto nasprotujejo. Tako kot mi tudi Ward in Reilly s sodelavci, ki sta leta 2013 pregledala šest meta analiz, nista našla povezave med genotipom 677TT in večjim tveganjem za pojav prirojjenih srčnih napak v severnoameriški populaciji (17). Do enakih zaključkov so prišli tudi v študiji primerov in kontrol na Nizozemskem, kjer niso uspeli dokazati vpliva matrinega genotipa MTHFR na pojavnost prirojene srčne napake pri otroku (23). Prav tako je Kocakap v Turčiji ugotovil, da je porazdelitev genotipov polimorfizma MTHFR 677 C>T primerljiva med preiskovano in kontrolno skupino (30). Wang in Hou tako kot mi nista ugotovila statistično značilne razlike v porazdelitvi genotipov polimorfizma 677 C>T med materami bolnikov s prirojeno srčno napako in kontrolo v evropski populaciji. V nasprotju z nami sta statistično značilno sicer dokazala vpliv polimorfizma 677 C>T pri otrocih na večje tveganje za prirojene srčne napake, vendar pa je ta vpliv bolj izražen v azijski populaciji otrok z mutiranim genotipom 677TT kot v evropski populaciji. Nista uspela dokazati vpliva polimorfizma MTHFR 1298 A>C (rs1801131) na tveganje za prirojene srčne napake pri materah in otrocih, kar je skladno z našimi ugotovitvami (27). Naši rezultati nasprotujejo rezultatom, ki sta jih v svoji študiji na Kitajskem pridobila Shi in Yang s sodelavci. Potrdili so namreč statistično značilno razliko v frekvencah genotipov MTHFR rs1801131 in rs1801133 med kontrolno in preiskovano skupino. Z vključitvijo okoljskih dejavnikov pa so uspeli dokazati vpliv mutiranega genotipa 1298CC pri materi na tveganje za pojav prirojjenih srčnih napak pri otroku (24). Prav tako so v študiji na

Kitajskem v bolnišnici Xin Hua uspeli dokazati povezavo med polimorfizmom MTHFR 677 C>T (rs1801133) in Tetralogijo Fallot (14). Tudi na medicinski fakulteti na Kitajskem je Xu s svojimi sodelavci v meta analizi ugotovil povezavo med mutiranim genotipom otroka in pojavnostjo prirojene srčne napake. Vendar pa tako kot mi tudi oni niso uspeli dokazati vpliva materinega genotipa na tveganje za pojav prirojene srčne napake (25). V drugi meta analizi, ki je bila prav tako narejena na Kitajskem, so prišli do zaključka, da prisotnost mutiranega alela T (rs1801133) poveča dovzetnost za razvoj prirojene srčne napake, še posebej v azijski populaciji mater in otrok, ter da kot faktor tveganja v evropski populaciji otrok nastopa mutiran alel C (rs1801131) (26). V Egiptu je Zidan s sodelavci ugotovil, da je statistično značilno več mutiranih homozigotov 1298CC in 677TT v skupini otrok s prirojeno srčno napako in njihovih mater. Otroci z mutiranim genotipom 677TT in 1298CC imajo večje tveganje za pojav prirojene srčne napake, genotipa 677CT in 1298AC pa naj tveganja ne bi povečala (28). V študiji, ki je bila izvedena v Indiji, so prišli do zaključka, da genotip 1298CC statistično značilno poveča tveganje za razvoj prirojenih srčnih napak, tako kot mi pa so ugotovili, da polimorfizem MTHFR 677 C>T na to tveganje ne vpliva (29). Glavni vzrok za nasprotujoče si rezultate študij bi lahko poleg etnične pripadnosti bil tudi različen način analize rezultatov genotipizacije. Nekatere študije so polimorfizma 677 C>T in 1298 A>C analizirali ločeno, nekatere pa tako kot mi skupaj. Po našem mnenju ta pristop bolj relevantno odraža dejansko encimsko aktivnost, saj na aktivnost MTHFR vplivata oba polimorfizma.

4.2.2 MTRR rs1801394

Genotip encima MTRR smo razdelili v kategoriji divji tip (66AA) in mutiran genotip (66GG in 66AG). Pri materah (Chi-kvadrat test, $p = 0,508$) in otrocih (Chi-kvadrat test, $p = 0,155$) ni statistično značilne razlike med KS in TS glede na frekvenco genotipov MTRR (preglednica VI). Sklepamo lahko, da prisoten mutiran genotip 66GG ali 66AG pri materi in/ali otroku ne vpliva na pojav prirojene srčne napake pri otrocih v slovenski populaciji. Enako so dokazali tudi v študiji na Nizozemskem, kjer so ugotovili, da genotip 66GG ni povezan s povečanim tveganjem za pojav prirojene srčne napake (31). Prav tako skladno z našimi ugotovitvami Wang s sodelavci na Kitajskem ni ugotovil vpliva prisotnosti mutiranega G alela (genotipa GA ali AA) na tveganje za pojav prirojenih srčnih napak (32). Vpliv polimorfizma A66G je ocenjeval tudi Rozen s sodelavci v Kanadi. Ugotovili so, da pri otrocih prisotnost mutiranega genotipa 66AG in 66GG celo zmanjša tveganje za

pojav prirojene srčne napake, oziroma zmanjša tveganje za defekt v prekatnem srčnem pretinu (9). V nasprotju z našimi ugotovitvami sta v meta analizi Cai in Zhang s sodelavci povezala prisotnost mutiranega G alela z večjim tveganjem za prirojene srčne napake (33). Prav tako našim rezultatom nasprotuje raziskava, ki so jo izvedli v bolnišnici na Kitajskem na oddelku za pediatrično kardiologijo, v kateri so dokazali povezavo med mutiranim genotipom 66GG in večjim tveganjem za pojav prirojene srčne napake (34).

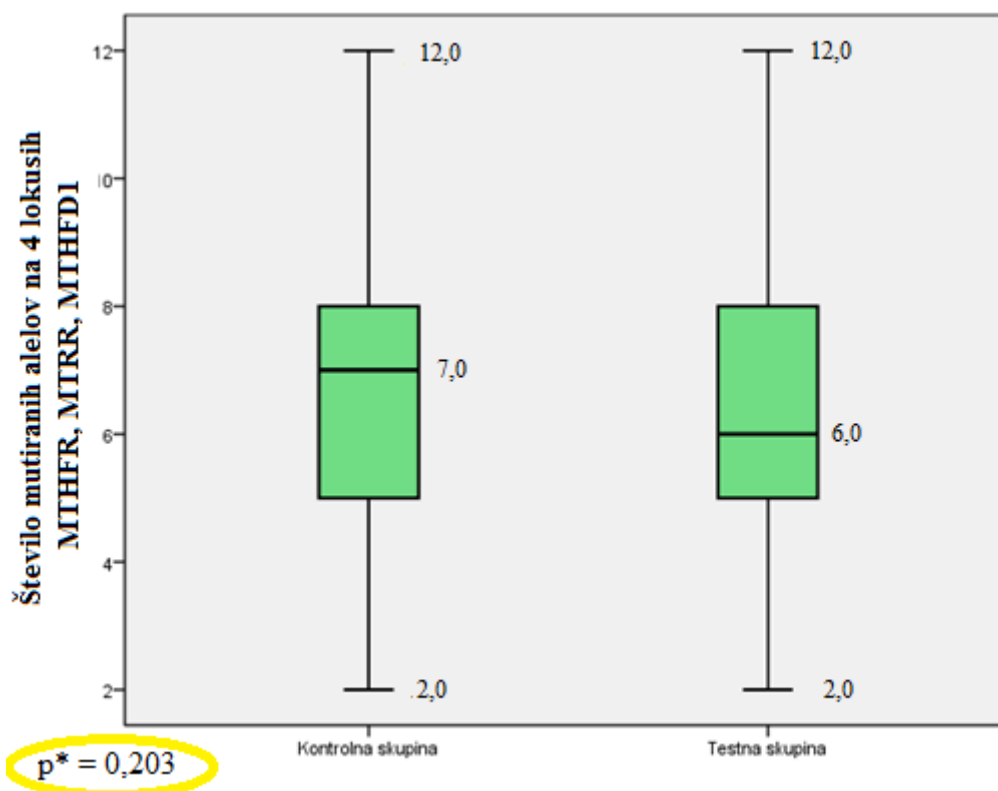
4.2.3 MTHFD1 rs2236225

Genotip encima MTHFD1 smo razdelili v dve kategoriji, v kategorijo z divjim tipom genotipa (1598GG) in kategorijo z mutiranimi genotipi (1598AA in 1598AG). Ugotovili smo, da ni statistično značilne razlike (Chi-kvadrat test, $p = 0,887$) v porazdelitvi genotipov encima MTHFD1 med KS in TS pri materah (preglednica VI). Pri otrocih smo ugotovili mejno statistično značilno razliko (Chi-kvadrat test, $p=0,049$) v frekvencah genotipov encima MTHFD1 med KS in TS. V KS ima 55 (27,6%) otrok genotip divjega tipa (1598GG), v TS pa 56 (37,6%) otrok. Mutirane genotipe 1298AA ali 1958AG ima v KS 144 (72,4%) otrok, v TS pa 93 (62,4%) otrok. Več otrok v KS kot v TS ima torej enega izmed mutiranih genotipov MTHFD1. Sklepamo lahko, da imajo mutirani genotipi MTHFD1 rahlo zaščitni vpliv na pojavnost prirojenih srčnih napak pri otrocih v slovenski populaciji. Tako kot mi tudi v študiji na Kitajskem v bolnišnici Xin Hua, kjer so ugotavljali vpliv polimorfizma rs2236225 na tveganje za nastanek prirojene srčne napake, natančneje Tetralogije Fallot, niso ugotovili statistično značilne razlike v prisotnosti mutiranega genotipa ter genotipa divjega tipa med kontrolno skupino in skupino bolnikov s tetralogijo Fallot (14). Dobljeni rezultati se ne skladajo z rezultati, ki so jih dobili v študiji na Kitajskem v provinci Liaoning, saj v tej študiji namreč niso ugotovili statistično značilne razlike v prisotnosti posameznih genotipov encima MTHFD1 med KS in TS (38). V pokrajini Quebec v Kanadi so ugotovili, da imajo otroci v preiskovani skupini z mutiranim genotipom 1598AA večje tveganje za razvoj prirojene srčne napake, kar nasprotuje našim ugotovitvam, pri materah pa tako kot mi niso uspeli dokazati vpliva mutiranega genotipa 1598AA na to tveganje (39).

4.2.4 ANALIZA KOMBINACIJ TVEGANIH GENOTIPOV

Preverili smo število mutiranih alelov na 4 lokusih v treh genih MTHFR, MTRR in MTHFD1 v KS in TS, oziroma ali obstaja povezava med številom mutiranih alelov in

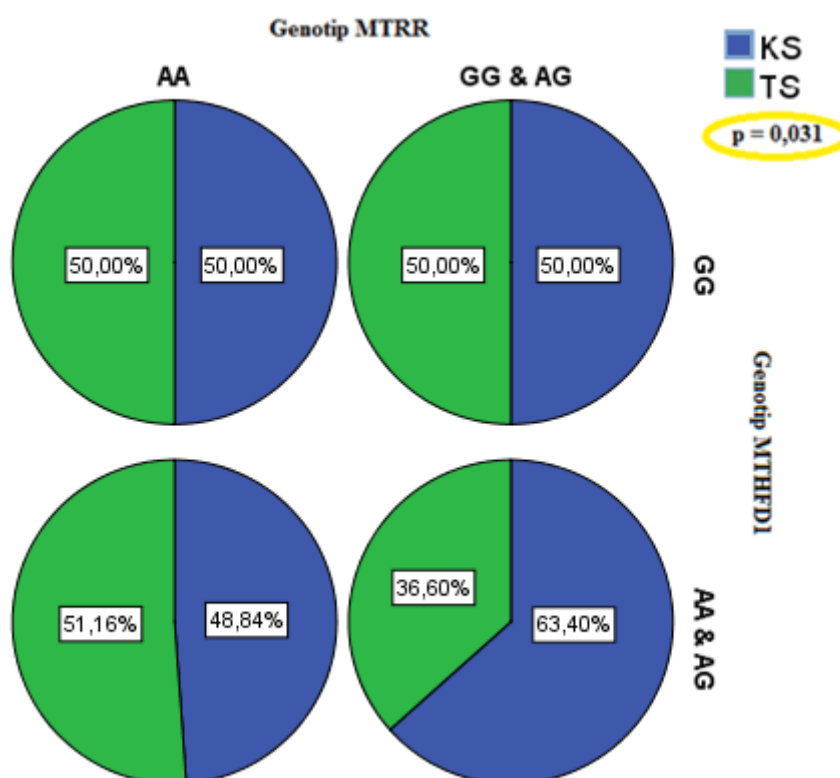
pojavnostjo prirojenih srčnih napak. Izvedli smo torej Kolmogorov-Smirnov test normalnosti in ker se število mutiranih alelov v KS in TS ne porazdeljuje normalno ($p < 0,001$), smo to spremenljivko opisali z mediano, minimumom, maksimumom ter naredili grafični prikaz s kvantilnim diagramom, izvedli Mann-Whitneyev U-test in postavili hipotezi H_0 in H_1 . Hipoteza H_0 trdi, da je frekvenca mutiranih alelov enaka v KS in TS, hipoteza H_1 pa nasprotuje ničelni. Iz kvantilnega diagrama je na sliki 16 vidno, da med KS in TS ne obstaja statistično značilna razlika ($p = 0,203$) v številu mutiranih alelov, ki so prisotni pri posamezniku.



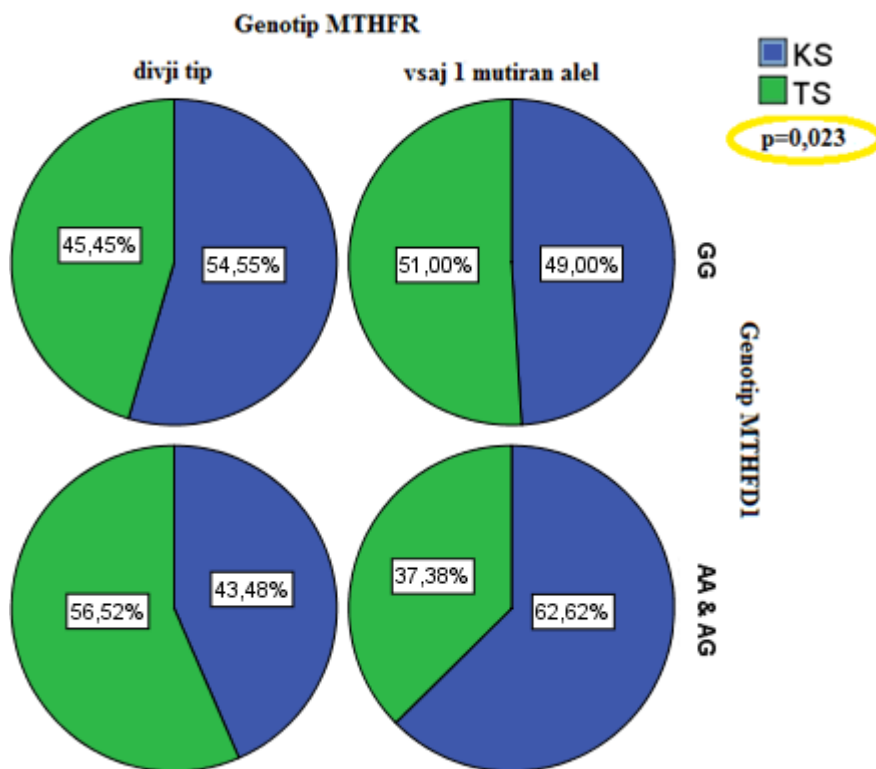
Slika 16: Kvantilni prikaz števila mutiranih alelov na 4 preiskovanih lokusih v kontrolni (n=199) in testni (n=149) skupini ter rezultat Mann-Whitneyevega U-testa

Nato smo primerjali frekvence različnih možnih kombinacij obravnavanih genotipov med KS in TS ter izvedli Chi-kvadrat test. Nobena kombinacija genotipov mater nam ni podala statistično značilne razlike med skupinama. Frekvence kombinacij genotipov smo določili tudi otrokom v KS in TS. Pri izvedbi Chi-kvadrat testa smo pri otrocih ugotovili dve kombinaciji genotipov, ki se statistično značilno razlikujeta med KS in TS (sliki 17 in 18). V KS je imelo nepričakovano več otrok (Chi-kvadrat test, $p = 0,031$) kombinacijo mutiranih genotipov MTRR 66GG/66AG in MTHFD1 1598AA/1598AG. Iz tega lahko

sklepamo, da ima hkratna prisotnost mutiranih alelov MTRR in MTHFD1 zaščitno vlogo pri pojavu prirojenih srčnih napak. Čeprav bodo za potrditev potrebne nadaljnje študije, pa bi to lahko razložilo visoko frekvenco mutiranih alelov MTHFD1 rs2236225 in MTRR rs1801394 v kavkazijskih populacijah. Protektivni učinek prisotnega mutiranega alela MTRR je v svoji študiji ugotovil tudi Rozen s sodelavci, vendar ne v kombinaciji s prisotnim mutiranim alelom MTHFD1 (9). Ugotovili smo tudi, da ima protektivni učinek kombinacija vsaj enega mutiranega MTHFR alela in mutiranih MTHFD1 genotipov 1598AA/1598AG ($p = 0,023$). Študije, ki bi ugotovila tak zaščitni učinek, še ni. Zanimivo je, da v obeh kombinacijah tveganih genotipov nastopa MTHFD1, ki katalizira 3 različne reakcije v folatnem ciklu. Rezultati se zdijo presenetljivi, saj mutacije v genih folatnega cikla ponavadi povezujemo s patološkimi stanji. Ker pa gre pri prirojenih srčnih napakah za multifaktorsko dedovanje, nam izolirana analiza posameznih genotipov lahko da zavajajočo sliko. Rezultate analize kombinacije genotipov pa je težko razložiti z mehanističnega vidika, saj so vsi trije preučevani encimi del metabolnega cikla in je zato njihove medsebojne vplive težko predvideti.



Slika 17: Grafični prikaz kombinacij genotipov MTRR in MTHFD1 pri otrocih ter rezultat Chi-kvadrat testa



Slika 18: Grafični prikaz kombinacij genotipov MTHFR in MTHFD1 pri otrocih ter rezultat Chi-kvadrat testa

4.3 VREDNOTENJE VPLIVA GENOTIPOV IN DRUGIH OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA POJAVNOST PRIROJENE SRČNE NAPAKE V MODELIH LOGISTIČNE REGRESIJE

Povezavo med okoljskimi dejavniki, genotipi in njihovim vplivom na pojavnost prirojelih srčnih napak v slovenski populaciji smo ugotavljali tako, da smo izvedli logistično regresijo. Oblikovali smo štiri modele logistične regresije, dva za matere in dva za otroke. Poleg analiziranih genotipov smo v modele vključili tudi spremenljivke, ki so pokazale statistično značilno razliko med KS in TS v enostavnih statističnih testih. Če sta spremenljivki kazali visoko stopnjo korelacije, smo eno izmed spremenljivk izključili iz modela logistične regresije. Končni nabor spremenljivk torej predstavljajo: uporaba drugih prehranskih dopolnil v času nosečnosti, časovni okvir jemanja folatnih pripravkov, status kajenja matere, starost matere ob zanositvi in družinska anamneza.

Tako za matere kot njihove otroke v KS in TS smo oblikovali dva modela logistične regresije, v katere smo spremenljivke vnašali v treh blokih. V prvi blok smo vključili spremenljivki starost matere ob zanositvi in prisotnost družinske anamneze. V drugi blok

smo dodali spremenljivke: uporaba drugih prehranskih dopolnil v času nosečnosti, časovni okvir jemanja folatnih pripravkov in status kajenja matere. V tretji blok pa smo spremenljivkam dodali še genotipe mater ali otrok. V vsakem bloku smo preverili, ali je model z izbranimi spremenljivkami ustrezen oziroma ali spremenljivke v modelu vplivajo na tveganje za pojav prirojenih srčnih napak. Izvedli smo Hosmer-Lemeshow test in primerjali vrednost p s stopnjo tveganja 0,05. Če je vrednost p večja od 0,05 pomeni, da model ustrezno opisuje naše podatke. Prav tako smo izvedli Omnibus test, ki nam je povedal, ali je model statistično značilen kot celota. Spremenljivke, ki so vključene v model, kot celota dobro ločujejo med KS in TS, če je vrednost p manjša od 0,05. V vsakem bloku smo pogledali tudi Nagelkerkejev R^2 koeficient, ki nam je povedal, kolikšen odstotek tveganja za pojav prirojenih srčnih napak lahko s tem modelom opišemo. V en model smo za matere in otroke poleg okoljskih dejavnikov vključili tudi genotipe MTHFR, MTHFD1 in MTRR. Za slednja dva smo uporabili genotip divjega tipa in mutirani genotip, pri encimu MTHFR pa smo uporabili dve alternativni klasifikaciji genotipa.

Matere

Pri materah smo v obeh modelih v prvi blok vključili spremenljivki starost matere ob zanositvi in prisotnost pozitivne družinske anamneze. Dobili smo model, s katerim lahko opišemo 12,3% primerov tveganja za pojav prirojenih srčnih napak, Nagelkerkejev R^2 koeficient znaša namreč 0,123. Več spremenljivk smo dodali v drugem bloku, to so status kajenja matere, časovni okvir jemanja folatnih pripravkov in jemanje drugih prehranskih dopolnil v času nosečnosti. Z vključitvijo teh spremenljivk smo model izboljšali, z njimi lahko pojasnimo 26,4 % tveganja za pojav prirojenih srčnih napak. Nagelkerkejev R^2 koeficient je 0,264. Statistično značilen vpliv na nastanek prirojenih srčnih napak so imeli nižja starost matere ob zanositvi in prisotnost družinske anamneze, kajenje matere, začetek jemanja folatov kasneje kot 3 tedne po zanositvi in jemanje mineralov (Ca, Mg). V našem vzorcu so imele mlajše matere nekoliko povečano tveganje za rojstvo otrok s srčno napako. Pričakovano smo ugotovili, da pozitivna družinska anamneza predstavlja približno 8x večjo verjetnost za pojav prirojenih srčnih napak pri otrocih ter da imajo matere kadilke približno 2x večjo verjetnost za pojav prirojenih srčnih napak pri otrocih. Matere, ki folatnih pripravkov niso uporabljale v prvem trimestrju nosečnosti, so imele pričakovano približno 5x večjo verjetnost za pojav prirojenih srčnih napak pri otrocih. Ni pa bilo razlik

med tistimi, ki so začele z jemanjem folatov prej kot 3 tedne po zanositvi, in tistimi, ki so z jemanjem začele kasneje. Jemanje mineralov (Ca, Mg) za približno 4x poveča verjetnost. V tretji blok, naš končni model (preglednica VII), smo spremenljivkam dodali tudi genotipe encimov MTRR in MTHFD1, torej divjega tipa in mutirani genotip ter genotip encima MTHFR, in sicer nemutiran genotip in genotipe, v katerih je prisoten vsaj en mutiran alel. Po dodatku genotipov mater smo dobili dober model, Hosmer-Lemeshow test nam je podal vrednost $p = 0,734$ in Omnibus test vrednost $p < 0,001$. S tem modelom lahko pojasnimo 26,8% tveganja za pojav prirojenih srčnih napak pri otrocih, Nagelkerkejev R^2 koeficient je 0,268. Pristnost kateregakoli izbranega genotipa ni pokazala statistično značilnega vpliva na nastanek prirojenih srčnih napak.

Preglednica VII: Prikaz končnega modela logistične regresije 1–matere

Model 1		Razmerje obetov (RO)	95 % interval zaupanja za RO	p
Starost matere ob zanositvi		0,947	0,899–0,997	0,040
Prisotna družinska anamneza		8,035	3,407–18,953	<0,001
Status kajenja (Referenčna kategorija: nekadilka)	Kadilka	2,253	1,103–4,604	0,026
	Bivša kadilka	0,786	0,446–1,387	0,406
Prehranska dopolnila s folno kislino (Referenčna kategorija: prej kot 3 tedne po zanositvi)	Kasneje kot 3 tedne po zanositvi	1,072	0,609–1,886	0,809
	Brez folatnih pripravkov	4,776	2,371–9,621	<0,001
Jemanje drugih prehranskih dopolnil (Referenčna kategorija: brez prehranskih dopolnil)	Multivitamini	0,919	0,389–2,168	0,847
	Minerali	3,980	1,774–8,929	0,001
	Drugi	0,660	0,145–3,011	0,592
MTHFD1 (Referenčna kategorija: GG)	AA, AG	1,085	0,649–1,816	0,755
MTRR (Referenčna kategorija: AA)	GG, AG	0,880	0,458–1,690	0,701
MTHFR (Referenčna kategorija: genotip divjega tipa)	Genotip z vsaj enim mutiranim alelom	1,669	0,808–3,447	0,166

V drugem modelu (preglednica VIII) smo v tretjem bloku dodali materine genotipe encima MTHFD1 in MTRR, spremenili pa smo klasifikacijo genotipov mater za MTHFR, torej vključili smo genotipe z encimsko aktivnostjo več kot 60% in genotipe z encimsko aktivnostjo manj kot 60%. Zopet smo dobili dober model, saj nam je Hosmer-Lemeshow test podal vrednost $p = 0,543$, Omnibus test pa vrednost $p < 0,001$. Z drugim modelom lahko pojasnimo 27,0% tveganja za pojav prirojenih srčnih napak, Nagelkerkejev R^2 koeficient je 0,270. Tudi v tem primeru nismo ugotovili povezave med prisotnostjo določenega genotipa in pojavnostjo prirojenih srčnih napak.

Preglednica VIII: Prikaz končnega modela logistične regresije 2–matere

Model 2		Razmerje obetov (RO)	95 % interval zaupanja za RO	p
Starost matere ob zanositvi		0,948	0,900–0,999	0,044
Prisotna družinska anamneza		8,195	3,485–19,270	<0,001
Status kajenja (Referenčna kategorija: nekadilka)	Kadilka	2,206	1,081–4,504	0,030
	Bivša kadilka	0,794	0,450–1,400	0,425
Prehranska dopolnila s folno kislino (Referenčna kategorija: prej kot 3 tedne po zanositvi)	Kasneje kot 3 tedne po zanositvi	1,069	0,608–1,879	0,817
	Brez folatnih pripravkov	4,605	2,298–9,228	<0,001
Jemanje drugih prehranskih dopolnil (Referenčna kategorija: brez prehranskih dopolnil)	Multivitamini	0,920	0,389–2,177	0,850
	Minerali	3,801	1,689–8,5551	0,001
	Drugi	0,656	0,143–3,004	0,587
MTHFD1 (Referenčna kategorija: GG)	AA, AG	1,068	0,639–1,786	0,801
MTRR (Referenčna kategorija: AA)	GG, AG	0,837	0,437–1,604	0,592
MTHFR (Referenčna kategorija: genotip z encimsko aktivnostjo > 60%)	Genotip z aktivnostjo encima < 60%	1,166	0,680–1,998	0,577

Otroci

Tako kot pri materah smo enako naredili tudi za otroke. Poleg statistično značilnih neodvisnih spremenljivk okoljskih dejavnikov tveganja smo v tretji in četrti model vključili genotipe otrok za MTHFR, MTHFD1 in MTRR. Za MTHFD1 in MTRR smo uporabili kategoriji divjega tipa in mutiran genotip, pri encimu MTHFR pa smo v tretjem modelu uporabili genotip divjega tipa in/ali prisotnost vsaj enega mutiranega alela, v četrtem modelu pa smo uporabili kategoriji genotipov z encimsko aktivnostjo več kot 60% in manj kot 60%. V tretjem in četrtem modelu (preglednici IX in X) smo v prvem bloku dobil model, s katerim lahko z vključenimi spremenljivkami pojasnimo 11,5% tveganja za pojav prirojenih srčnih napak pri otrocih. Nagelkerkejev R^2 koeficient je 0,115. V drugi blok smo vključili več spremenljivk, družinski anamnezi in starosti matere ob zanositvi smo dodali status kajenja matere, časovni okvir jemanja pripravkov s folati in jemanje drugih prehranskih dopolnil v času nosečnosti. Model smo s tem izboljšali, saj lahko z vključitvijo teh spremenljivk pojasnimo 26,4% tveganja za pojav prirojenih srčnih napak, Nagelkerkejev R^2 koeficient je 0,264. Ugotovili smo, da pozitivna družinska anamneza približno 8x poveča verjetnost za pojav prirojenih srčnih napak pri otrocih. Otroci, katerih matere so kadilke, pa imajo približno 2x večjo verjetnost za pojav prirojenih srčnih napak. Verjetnost za nastanek prirojenih srčnih napak se 5x poveča pri otrocih, katerih matere ne uporabljajo pripravkov s folati v prvem trimestru nosečnosti v primerjavi s tistimi, ki z jemanjem folatov začnejo prej kot 3 tedne po zanositvi. V tretji blok tretjega modela smo spremenljivkam dodali tudi genotipe encimov MTHFD1, MTRR in MTHFR (Preglednica IX), in sicer genotip divjega tipa in mutiran genotip pri MTRR in MTHFD1, ter genotip divjega tipa in genotipe z vsaj enim mutiranim alelom pri MTHFR. Dobili smo dober model, Hosmer-Lemeshow test nam je podal vrednost $p = 0,895$, Omnibus test pa vrednost $p < 0,001$. S tem modelom lahko opišemo 28,5% tveganja za nastanek prirojenih srčnih napak pri otrocih, Nagelkerkejev R^2 koeficient je namreč 0,285. Ugotovili smo, da tudi otrokov genotip nima statistično značilnega vpliva na nastanek prirojenih srčnih napak.

Preglednica IX: Prikaz končnega modela logistične regresije 3–otroci

Model 3	Razmerje obetov (RO)	95 % interval zaupanja za RO	p
Starost matere ob zanositvi	0,953	0,907–1,003	0,063
Prisotna družinska anamneza	8,583	3,579–20,584	<0,001

Status kajenja (Referenčna kategorija: nekadilka)	Kadilka	2,177	1,070–4,429	0,032
	Bivša kadilka	0,720	0,403–1,285	0,266
Prehranska dopolnila s folno kislino (Referenčna kategorija: prej kot 3 tedne po zanositvi)	Kasneje kot 3 tedne po zanositvi	1,172	0,658–2,088	0,589
	Brez folatnih pripravkov	4,871	2,420–9,805	<0,001
Jemanje drugih prehranskih dopolnil (Referenčna kategorija: brez prehranskih dopolnil)	Multivitamini	0,978	0,409–2,337	0,960
	Minerali	3,914	1,743–8,793	0,001
	Drugi	0,851	0,184–3,933	0,837
MTHFD1 (Referenčna kategorija: GG)	AA, AG	0,635	0,375–1,075	0,091
MTRR (Referenčna kategorija: AA)	GG, AG	0,538	0,284–1,018	0,057
MTHFR (Referenčna kategorija: genotip divjega tipa)	Genotip z vsaj enim mutiranim alelom	0,662	0,298–1,468	0,310

V četrti model (preglednica X) smo v tretjem bloku zamenjali genotip encima MTHFR, uporabili smo kategoriji genotipi z encimsko aktivnostjo več kot 60% in genotipi z aktivnostjo manj kot 60%. Tudi v tem primeru nismo ugotovili statistično značilnega vpliva genotipov na pojav prirojenih srčnih napak. Sicer smo dobili model, s katerim opišemo 28,2% tveganj za nastanek prirojenih srčnih napak pri otrocih, Nagelkerkejev R^2 koeficient znaša 0,282. Hosmer-Lemeshow test nam je podal vrednost $p = 0,570$, Omnibus test pa vrednost $p < 0,001$.

Preglednica X: Prikaz končnega modela logistične regresije 4–otroci

Model 4		Razmerje obetov (RO)	95 % interval zaupanja za RO	p
Starost matere ob zanositvi		0,952	0,905–1,001	0,054
Prisotna družinska anamneza		8,619	3,588–20,704	<0,001
Status kajenja (Referenčna kategorija: nekadilka)	Kadilka	2,137	1,052–4,342	0,036
	Bivša kadilka	0,722	0,405–1,289	0,271

Prehranska dopolnila s folno kislino (Referenčna kategorija: prej kot 3 tedne po zanositvi)	Kasneje kot 3 tedne po zanositvi	1,154	0,649–2,050	0,626
	Brez folatnih pripravkov	4,862	2,412–9,802	<0,001
Jemanje drugih prehranskih dopolnil (Referenčna kategorija: brez prehranskih dopolnil)	Multivitamini	1,000	0,417–2,395	0,999
	Minerali	3,933	1,754–8,816	0,001
	Drugi	0,835	0,181–3,858	0,817
MTHFD1 (Referenčna kategorija: GG)	AA, AG	0,635	0,375–1,075	0,091
MTRR (Referenčna kategorija: AA)	GG, AG	0,539	0,285–1,021	0,058
MTHFR (Referenčna kategorija: genotip z encimsko aktivnostjo > 60%)	Genotip z aktivnostjo encima < 60%	0,921	0,521–1,627	0,777

4.4 ANALIZA PAROV MATI-OTROK, KJER MATERE V NOSEČNOSTI NISO UŽIVALE FOLATNIH PRIPRAVKOV

Selekcionirano smo izbrali populacijo mater in njihovih otrok, ki niso jemale folatnih pripravkov v času nosečnosti. Želeli smo namreč dokazati vpliv polimorfizmov v genih, ki sodelujejo pri presnovi folatov na pojavnost prirojnih srčnih napak v populaciji mater, ki niso jemale folatnih pripravkov, saj nekatere študije kažejo, da presežek folatov izniči vpliv omenjenih polimorfizmov (31,38,53). Tako smo skupno analizirali 57 parov mater in otrok v KS in TS. Oblikovali smo kategorije in določili frekvence v posameznih kategorijah za KS in TS. Izvedli smo Chi-kvadrat test in zopet opazovali vrednost Pearsonovega Chi-kvadrat koeficienta, vrednost p, in jo primerjali s stopnjo tveganja α 0,05. V primeru, ko je vrednost p manjša od stopnje tveganja α , pomeni statistično značilen vpliv genotipa encima, ki sodeluje v presnovi folatov na pojav prirojene srčne napake v populaciji mater, ki niso jemale folatnih pripravkov.

Iz preglednice XI je razvidno, da ima statistično značilno povečano tveganje za srčno napako divji tip genotipa encima MTHFD1 pri otrocih, oziroma, da mutirani alel A deluje protektivno. Ta vpliv je bolj izražen v skupini mater, ki folatov niso uživale, kot v mešani populaciji mater in otrok. V tej podskupini mater in otrok drugi preučevani polimorfizmi niso pokazali statistično značilnega vpliva na pojavnost prirojnih srčnih napak.

Protektivni učinek MTHFD1 rs2236225 A alela smo dokazali tudi v mešani populaciji mater in otrok v kombinaciji z mutiranimi genotipi MTHFR in MTRR (glej poglavje 4.2.4).

Preglednica XI: Frekvence genotipov mater in otrok za encime MTHFD1, MTRR in MTHFR v subpopulaciji mater, ki med nosečnostjo niso uživale folatnih pripravkov v kontrolni in testni skupini.

ENCIM	GENOTIP	Matere n (%)		Otroci n (%)	
		KS	TS	KS	TS
MTHFD1	GG	5 (27,8)	14 (35,9)	2 (11,1)	17 (43,6)
	AA	4 (22,2)	9 (23,1)	4 (22,2)	6 (15,4)
	AG	9 (50)	16 (41,0)	12 (66,7)	16 (41,0)
		p* = 0,789		p* = 0,530	
MTRR	AA	3 (16,7)	10 (25,6)	1 (5,6)	8 (20,5)
	GG	7 (38,9)	12 (30,8)	6 (33,3)	13 (33,3)
	AG	8 (44,4)	17 (43,6)	11 (61,1)	18 (46,2)
		p* = 0,712		p* = 0,319	
MTHFR	nemutiran	3 (16,7)	6 (15,4)	3 (16,7)	4 (10,3)
	vsaj 1 mutiran alel	15 (83,3)	33 (84,6)	15 (83,3)	35 (89,7)
		p* = 0,902		p* = 0,493	
MTHFR	Aktivnost >60%	12 (66,7)	25 (64,1)	14 (77,8)	32 (82,1)
	Aktivnost <60%	6 (33,3)	14 (35,9)	4 (22,2)	7 (17,9)
		p* = 0,850		p* = 0,704	
MTHFD1	GG	5 (27,8)	14 (35,9)	2 (11,1)	17 (43,6)
	AA in AG	13 (72,2)	25 (64,1)	16 (88,9)	22 (56,4)
		p* = 0,546		p* = 0,016	
MTRR	AA	3 (16,7)	10 (25,6)	1 (5,6)	8 (20,5)
	GG in AG	15 (83,3)	29 (74,4)	17 (94,4)	31 (79,5)
		p* = 0,453		p* = 0,150	

*Chi-kvadrat test

5 SKLEPI

V magistrski nalogi smo želeli oceniti vpliv izbranih polimorfizmov v genih encimov (MTHFR, MTRR in MTHFD1), ki sodelujejo pri presnovi folatov ter drugih sočasnih okoljskih dejavnikov na pojavnost prirojenih srčnih napak v slovenski populaciji. Prav tako smo želeli oceniti vpliv genotipov MTHFR, MTRR in MTHFD1 na pojavnost prirojenih srčnih napak pri materah, ki v času nosečnosti niso jemale folatnih pripravkov. Glavne ugotovitve magistrske naloge so:

- Pozitivna družinska anamneza 8x poveča verjetnost za pojav prirojene srčne napake pri otrocih.
- Matere s statusom kadilke imajo približno 2x večjo verjetnost za rojstvo otroka s prirojeno srčno napako.
- Verjetnost za pojav prirojene srčne napake pri otroku je 5x večja, če matere v prvem trimestrju nosečnosti ne jemljejo folatnih pripravkov, kot če z njihovim jemanjem začnejo prej kot 3 tedne po zanositvi. Verjetnost za srčno napako se ne razlikuje med materami, ki so folate začele uporabljati prej kot 3 tedne po zanositvi, in tistimi, ki so začele kasneje.
- Matere, ki so med nosečnostjo jemale minerale (Ca in Mg) imajo 4x večjo verjetnost za razvoj prirojenih srčnih napak pri otroku.
- Ni razlike v frekvencah genotipov MTHFR in MTRR med kontrolno in testno skupino.
- Več prisotnih mutiranih alelov na 4 lokusih v 3 genih (MTHFR, MTHFD1 in MTRR) pri posamezniku ni povezanih z večjim tveganjem za razvoj prirojenih srčnih napak pri otrocih v slovenski populaciji.
- Mutirani genotipi MTHFD1 delujejo zaščitno pred pojavom prirojene srčne napake. Ta vpliv je bolj izrazit v skupini mater, ki med nosečnostjo niso uživale pripravkov s folati.
- Mutirani genotipi encimov MTHFR in MTRR izolirano in v kombinaciji z nejeemanjem folatov matere ne vplivajo na tveganje za pojav prirojene srčne napake pri otrocih.
- Hkratna prisotnost mutiranih genotipov MTHFD1 in MTRR ter MTHFD1 in MTHFR deluje protektivno na pojavnost prirojenih srčnih napak.

- V modelih logistične regresije noben izmed preučevanih genotipov ni izkazoval povečano tveganje za nastanek srčnih napak.

6 LITERATURA

- (1) Bresjanac M, Rupnik M: Temelji fiziologije. Dostop: 12. 04. 2015
http://www.mf.uni-mb.si/mf/instituti/fizio/biologija/temelji_fiziologije.pdf
- (2) Društvo srčnih otrok. Dostop: 12. 04. 2015
www.srcki.si
- (3) Štiblar-Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T, Legan M: Anatomija, histologija in fiziologija, 2. izdaja, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2008: 99-104
- (4) Medicinenet, How the heart works. Dostop: 12. 04. 2015
http://www.medicinenet.com/heart_how_the_heart_works/page3.htm
- (5) Zorc M, Petrovič D: Razvoj srca. Med Razgl 2003; 42: 401-11
- (6) Kališnik M: Oris histologije z embriologijo, Medicinska fakulteta - inštitut za histologijo in embriologijo, Ljubljana, 2003: 271 - 73
- (7) Košnik M, Mravlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, 4.izdaja, Littera Pucta,d.o.o, Ljubljana, 2011: 213-34
- (8) Robida A: Otroške srčne bolezni in prirojene srčne hibe pri odraslih, Mladinska knjiga, Tiskarna, Ljubljana, 1998: 103-183
- (9) Christensen K, Zada Y, Rozen R, et al.: Risk of congenital heart defects is influenced by genetic variation in folate metabolism. Cardiology In The Young 2013; 23: 89-98
- (10) Czeizel A, Dudás I, Vereczkey A, Bánhidy F: Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. Nutrients 2013; 5(11): 4760-4775
- (11) Coşar A, Ipçioğlu O, Özcan Ö, Gültepe M: Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. Turkish Journal Of Medical Sciences 2014; 44(1): 1-9
- (12) Stover P: Physiology of Folate and Vitamin B12 in Health and Disease. Nutrition Reviews 2004; 62(6): S3-S12
- (13) Imbard A, Benoist J, Blom H: Neural tube defects, folic acid and methylation. International Journal Of Environmental Research And Public Health 2013; 10(9): 4352-4389
- (14) Jianbing H, Ju M, Lianyong J, Zhaolei J, Hao L, Fangbao: MTHFR rs1801133 C>T polymorphism is associated with an increased risk of tetralogy of Fallot. Biomedical Reports 2014; 2(2): 172-176

- (15) Bohanec P, Dolžan V: Genetski polimorfizmi encimov v presnovni poti folata v zdravi slovenski populaciji. *Zdrav vestn* 2004; 73: 807-13
- (16) Bailey B. L, Gregory F. J: Folate metabolism and requirements. *The journal of nutrition* 1999; 129: 779-782
- (17) Reilly R, McNulty H, Pentieva K, Strain J, Ward M: MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins?. *The Proceedings Of The Nutrition Society* 2014; 73(1): 47-56
- (18) Blom H, Smulders Y: Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal Of Inherited Metabolic Disease* 2011; 24: 75-81
- (19) Genetic Home Reference. Dostop: 14. 04. 2015
<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/snp>
- (20) Fakulteta za farmacijo. Seznam laboratorijskih preiskav in storitev: Gen za MTHFR, polimorfizem 677 C>T. Dostop: 15. 04. 2015
<http://www.ffa.uni-lj.si/raziskave/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko/seznam-laboratorijskih-preiskav-in-storitev/mthfr-677-ct/>
- (21) Fakulteta za farmacijo. Seznam laboratorijskih preiskav in storitev: Gen za MTHFR, polimorfizem 1298 A>C. Dostop 15. 04. 2015
<http://www.ffa.uni-lj.si/raziskave/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko/seznam-laboratorijskih-preiskav-in-storitev/mthfr-1298-ac/>
- (22) Rogers J, Massaro E: *Folate And Human Development*. Totowa, N.J.: Humana Press; 2002.
- (23) van Driel L, Verkleij-Hagoort A, Steegers-Theunissen R, et al.: Two MTHFR polymorphisms, maternal B-vitamin intake, and CHDs. *Birth Defects Research. Part A, Clinical And Molecular Teratology* 2008; 82(6): 474-481
- (24) Shi H, Yang S, Wang L, et al.: Study on Environmental Causes and SNPs of MTHFR, MS and CBS Genes Related to Congenital Heart Disease. *Plos One* 2015; 10(6):e0128646
- (25) Yin M, Dong L, Zheng J, Zhang H, Liu J, Xu Z: Meta analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects. *Annals Of Human Genetics* 2012; 76(1): 9-16
- (26) Xuan C, Li H, Lun L, et al.: Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: a meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Scientific Reports* 2014; 4: 7311

- (27) Wang W, Hou Z, Wang C, Wei C, Li Y, Jiang L: Association between 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and congenital heart disease: A meta-analysis. *Meta Gene* 2013; 1: 109-125.
- (28) Zidan H, Rezk N, Mohammed D: MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and their relation to homocysteine level in Egyptian children with congenital heart diseases. *Gene* 2013; 529(1): 119-124.
- (29) Koshy T, Venkatesan V, Perumal V, Hegde S, Paul S: The A1298C Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variant as a Susceptibility Gene for Non-Syndromic Conotruncal Heart Defects in an Indian Population. *Pediatric Cardiology* 2015; 36(7): 1470-1475
- (30) Sayin Kocakap B, Sanli C, Cabuk F, Koc M, Kutsal A: Association of MTHFR A1298C polymorphism with conotruncal heart disease. *Cardiology In The Young* 2015; 25(7): 1326-1331.
- (31) van Beynum I, Kouwenberg M, Blom H, et al.: MTRR 66A>G polymorphism in relation to congenital heart defects. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* 2006; 44(11): 1317-1323
- (32) Wang B, Liu M, Chen Y, et al.: Association of SNPs in genes involved in folate metabolism with the risk of congenital heart disease. *The Journal Of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal Of The European Association Of Perinatal Medicine, The Federation Of Asia And Oceania Perinatal Societies, The International Society Of Perinatal Obstetricians* 2013; 26(18): 1768-1777
- (33) Cai B, Zhang T, Song R, et al.: Genetic variant in MTRR, but not MTR, is associated with risk of congenital heart disease: an integrated meta-analysis. *Plos One* 2014; 9(3): e89609
- (34) Zeng W, Liu L, Tong Y, Liu H, Dai L, Mao M: A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital heart defects in the Chinese Han population. *Genetics And Molecular Research* 2011; 10(4): 2597-2605
- (35) OMIM MTHFD1 (172460). Dostop: 17. 04. 2015
<http://www.omim.org/entry/172460>
- (36) The National Center for Biotechnology Information (ID 4522). Dostop: 03. 05. 2015
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4522>

- (37) Fowdar J, Lason M, Szvetko A, Lea R, Griffiths L: Investigation of Homocysteine-Pathway-Related Variants in Essential Hypertension. *International Journal Of Hypertension* 2012; 1-9
- (38) Jun C, Wen-Li Z, Jng-Jing D, Shu-Qing L, Yong L: Relationship Between Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase and Congenital Heart Defect. *Biomedical & Environmental Sciences* 2005; 18(1): 58.
- (39) Christensen K, Rohlicek C, Rozen R, et al.: The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Human Mutation* 2009; 30(2): 212-220
- (40) Černe D, Ostanek B: *Biomedicinska analitika I, Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 136-147*
- (41) Life Science, Genotyping using the lightcycler 480 system. Dostop: 17. 05. 2015
<http://lifescience.roche.com/shop/products/genotyping-using-the-lightcycler-480-system>
- (42) Bio Rad, applications technologies, PCR. Dostop: 04. 08. 2015
<http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/pcr-primer-probe-chemistries>
- (43) Oster M, Riehle-Colarusso T, Alverson C, Correa A: Associations Between Maternal Fever and Influenza and Congenital Heart Defects. *The Journal Of Pediatrics* 2011; 158: 990-995
- (44) Sullivan P, Dervan L, Reiger S, Buddhe S, Schwartz S: Risk of Congenital Heart Defects in the Offspring of Smoking Mothers: A Population-Based Study. *The Journal Of Pediatrics* 2015; 166: 978-984
- (45) Verkleij-Hagoort A, van Driel L, Steegers-Theunissen R, et al.: Genetic and lifestyle factors related to the periconception vitamin B12 status and congenital heart defects: A Dutch case-control study. *Molecular Genetics And Metabolism* 2008; 94: 112-119
- (46) Watkins M, Botto L: Maternal Prepregnancy Weight and Congenital Heart Defects in the Offspring. *Epidemiology* 2001: 439
- (47) Shaw G, Carmichael S, Laurent C, Rasmussen S: Maternal Nutrient Intakes and Risk of Orofacial Clefts. *Epidemiology* 2006: 285
- (48) Obermann-Borst S, Vujkovic M, Steegers-Theunissen R, et al.: A maternal dietary pattern characterised by fish and seafood in association with the risk of congenital heart defects in the offspring. *An International Journal Of Obstetrics And Gynaecology* 2011; (10): 1205

- (49) Skrivarnik S: Zdravstveno vzgojno delo pri pacientkah z gestacijskih diabetesom, Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, fakulteta za zdravstvene vede, Maribor, 2010: 9
- (50) Muhammad A, Khan M, Khan I, Anwar T: Frequency of congenital heart diseases in infants of diabetic mothers referred to pediatrics department. *Journal Of Postgraduate Medical Institute* 2014; 28(1): 37-41
- (51) Hussain M, Irshad M, Khattak A, Khan B: Frequency of various neonatal complications in infants born to diabetic mothers - a hospital base study. *Journal Of Postgraduate Medical Institute* 2011; 25(3): 227-232
- (52) Thomas S, Ajaykumar B, Sarma P, et al.: Cardiac Malformations Are Increased in Infants of Mothers with Epilepsy. *Pediatric Cardiology* 2008; 29(3): 604
- (53) Botto L, Mulinare J, Erickson J: Occurrence of Congenital Heart Defects in Relation to Maternal Multivitamin Use. *American Journal Of Epidemiology* 2009; 151(9): 878-884

7 PRILOGE

1. Rezultati genotipizacije TS

TS	MTHFD1 rs2236225 1598 G>A	MTRR rs1801394 66 A>G	MTHFR rs1801131 1298 A>C	MTHFR rs1801133 677 C>T
SRC_001_M	GG	AG	AC	CC
SRC_001_C	GG	AA	CC	CC
SRC_002_M	GG	AG	AA	CT
SRC_002_C	GA	AG	AA	CT
SRC_003_M	GA	GG	AA	CC
SRC_003_C	GA	AG	AA	CT
SRC_004_M	GA	AG	AC	CC
SRC_004_C	GA	AA	AC	CC
SRC_005_M	GA	AG	AC	CT
SRC_005_C	GG	AA	AC	CT
SRC_006_M	GA	AG	AA	CT
SRC_006_C	GG	AG	AC	CC
SRC_007_M	GA	AG	AA	CC
SRC_007_C	GA	AG	AA	CC
SRC_008_M	GA	AG	AC	CC
SRC_008_C	GA	AA	CC	CC
SRC_009_M	GA	AG	AC	CT
SRC_009_C	GG	AA	AC	CC
SRC_010_M	GG	GG	AA	TT
SRC_010_C	GA	GG	AC	CT
SRC_011_M	GG	AG	AA	CT
SRC_011_C	GA	GG	AA	CC
SRC_012_M	GG	GG	AA	CT
SRC_012_C	GG	AG	AA	CT
SRC_013_M	AA	GG	AA	CC
SRC_013_C	GA	GG	AA	CC
SRC_014_M	GG	AG	AC	CC
SRC_014_C	GA	AG	AA	CT
SRC_015_M	GG	AG	CC	CC
SRC_015_C	GG	AG	AC	CT
SRC_016_M	GG	GG	AA	TT

SRC_016_C	GA	GG	AA	TT
SRC_017_M	GA	AA	AC	CT
SRC_017_C	GA	AG	CC	CC
SRC_018_M	AA	AA	AA	CT
SRC_018_C	AA	AG	AA	CC
SRC_019_M	GA	GG	AA	TT
SRC_019_C	GA	AG	AA	TT
SRC_020_M	GA	AG	AA	CT
SRC_020_C	GG	GG	AA	CT
SRC_021_M	AA	GG	AC	CT
SRC_021_C	AA	AG	AC	CT
SRC_022_M	GA	AG	AC	CC
SRC_022_C	GA	AA	AC	CT
SRC_023_M	GA	AG	AC	CC
SRC_023_C	GA	AG	AA	CT
SRC_024_M	AA	GG	AA	TT
SRC_024_C	AA	GG	AA	TT
SRC_025_M	GG	GG	AC	CT
SRC_025_C	GG	GG	AA	CC
SRC_026_M	GA	GG	CC	CC
SRC_026_C	AA	GG	CC	CC
SRC_027_M	AA	GG	AC	CT
SRC_027_C	AA	AG	CC	CC
SRC_028_M	GG	AG	CC	CC
SRC_028_C	GA	AG	AC	CT
SRC_029_M	AA	AG	AA	CT
SRC_029_C	AA	AA	AA	TT
SRC_030_M	GG	AG	AA	CC
SRC_030_C	GG	/	AC	CC
SRC_031_M	AA	AA	CC	CC
SRC_031_C	AA	AA	AC	CT
SRC_032_M	GG	GG	AA	CT
SRC_032_C	GG	GG	AA	CC
SRC_033_M	AA	GG	AC	CT
SRC_033_C	AA	GG	CC	CC
SRC_034_M	GA	AG	AC	CT
SRC_034_C	GA	AG	AC	CC
SRC_035_M	GG	AA	AC	CT
SRC_035_C	GG	AG	AA	TT

SRC_036_M	GA	AG	AC	CT
SRC_036_C	AA	AG	AC	CT
SRC_037_M	GG	AG	AA	CC
SRC_037_C	GG	AG	AA	CT
SRC_038_M	AA	GG	AC	CC
SRC_038_C	AA	GG	AA	CC
SRC_039_M	AA	GG	AC	CC
SRC_039_C	GG	GG	AA	CT
SRC_040_M	GA	AG	AC	CC
SRC_040_C	GA	AG	AC	CC
SRC_041_M	GG	GG	AA	TT
SRC_041_C	GG	AG	AC	CT
SRC_042_M	AA	AG	CC	CC
SRC_042_C	GA	GG	AC	CC
SRC_043_M	GA	GG	AC	CC
SRC_043_C	GA	AG	AA	CT
SRC_044_M	GA	AA	AA	TT
SRC_044_C	GA	AA	AA	CT
SRC_045_M	GA	AA	AC	CT
SRC_045_C	GG	AA	AA	TT
SRC_046_M	GG	AA	AA	TT
SRC_046_C	GG	AG	AA	TT
SRC_047_M	GG	AG	AC	CT
SRC_047_C	GG	GG	AC	CT
SRC_048_M	GA	AG	AA	CT
SRC_048_C	GA	GG	AA	TT
SRC_049_M	GA	GG	AC	CT
SRC_049_C	AA	AG	AC	CC
SRC_050_M	AA	AA	CC	CC
SRC_050_C	GA	AA	AC	CC
SRC_051_M	GG	AA	AC	CT
SRC_051_C	GG	AG	AC	CC
SRC_052_M	GG	AG	AA	CC
SRC_052_C	GG	GG	AA	CT
SRC_053_M	GG	AG	AC	CT
SRC_053_C	GG	AG	AC	CT
SRC_054_M	NI MAME			
SRC_054_C	GA	AA	AC	CT
SRC_055_M	GG	AG	AC	CC

SRC_055_C	GG	AG	AA	CT
SRC_056_M	GG	AG	AC	CC
SRC_056_C	GA	AA	AC	CC
SRC_057_M	AA	GG	AC	CC
SRC_057_C	GA	GG	AC	CC
SRC_058_M	GA	AA	CC	CC
SRC_058_C	GG	AG	CC	CC
SRC_059_M	AA	GG	AA	CT
SRC_059_C	GA	AG	AA	CT
SRC_060_M	AA	AA	CC	CC
SRC_060_C	AA	AG	CC	CC
SRC_061_M	GG	AG	AA	TT
SRC_061_C	GG	AG	AC	CT
SRC_062_M	GA	GG	AC	CC
SRC_062_C	AA	AA	CC	CC
SRC_063_M	GA	AA	AA	CT
SRC_063_C	GG	AA	AA	CT
SRC_064_M	GA	AA	AA	CT
SRC_064_C	AA	AG	AC	CC
SRC_065_M	GA	AG	AA	TT
SRC_065_C	AA	AA	AC	CT
SRC_066_M	GA	GG	AC	CT
SRC_066_C	GA	GG	AA	CT
SRC_067_M	GA	AG	AA	CC
SRC_067_C	GA	GG	AA	CC
SRC_068_M	GG	AA	AC	CC
SRC_068_C1	GG	AA	CC	CC
SRC_068_C2	GG	AA	AA	CC
SRC_069_M	GG	GG	AA	CT
SRC_069_C	GG	GG	AC	CT
SRC_070_M	AA	AG	CC	CC
SRC_070_C	GA	GG	CC	CC
SRC_071_M	GA	GG	AC	CC
SRC_071_C	AA	GG	AA	CT
SRC_072_M	AA	GG	AC	CT
SRC_072_C	GA	AG	AA	CT
SRC_073_M	GA	AG	AA	CC
SRC_073_C	GG	GG	AA	CC
SRC_074_M	GG	AG	CC	CC

SRC_074_C	GA	GG	AC	CC
SRC_075_M	GA	AG	AC	CT
SRC_075_C	GA	AG	AC	CC
SRC_076_M	GG	AA	AA	TT
SRC_076_C	GA	AG	AC	CT
SRC_077_M	GA	AG	AA	CT
SRC_077_C	GG	AG	AA	CT
SRC_078_M	GA	GG	AA	CT
SRC_078_C	AA	AG	AA	TT
SRC_079_M	GA	AA	AC	CT
SRC_079_C	GA	AA	CC	CC
SRC_080_M	GA	AG	CC	CC
SRC_080_C	GG	AG	AC	CC
SRC_081_M	AA	AG	AA	CC
SRC_081_C	GA	AG	AA	CC
SRC_082_M	GA	AG	AA	CC
SRC_082_C	GA	AG	AC	CC
SRC_083_M	GG	GG	AA	TT
SRC_083_C	GA	AG	AA	TT
SRC_084_M	GG	AA	AC	CT
SRC_084_C	/	/	/	/
SRC_085_M	GA	AG	AC	CT
SRC_085_C	GA	AA	AA	CT
SRC_086_M	GG	GG	AA	CT
SRC_086_C	GG	AG	AA	TT
SRC_087_M	GG	AG	AC	CC
SRC_087_C	GG	GG	AC	CC
SRC_088_M	GG	GG	AC	CT
SRC_088_C	GG	AG	AC	CC
SRC_089_M	GA	GG	AC	CT
SRC_089_C	GA	AG	AA	TT
SRC_090_M	GA	AA	AC	CC
SRC_090_C	GG	AA	AA	CC
SRC_091_M	GG	AG	AA	CC
SRC_091_C	GG	GG	AA	CC
SRC_092_M	GA	AG	AA	CT
SRC_092_C	GG	AA	AA	CT
SRC_093_M	GG	GG	AC	CC
SRC_093_C	GG	GG	AA	CT

SRC_094_M	AA	GG	AC	CC
SRC_094_C	GA	GG	AA	CT
SRC_095_M	GA	GG	AC	CT
SRC_095_C	GA	AG	CC	CT
SRC_096_M	AA	GG	AA	CT
SRC_096_C	AA	GG	AC	CC
SRC_097_M	GG	GG	AA	TT
SRC_097_C	GA	GG	AA	CT
SRC_098_M	AA	AG	AC	CC
SRC_098_C	AA	GG	AA	CC
SRC_099_M	GA	AG	AC	CT
SRC_099_C	GA	AG	AC	CC
SRC_100_M	GA	AA	AC	CT
SRC_100_C	AA	AG	AA	CT
SRC_101_M	AA	AG	AC	CC
SRC_101_C	AA	AG	AA	CT
SRC_102_M	GA	AG	CC	CC
SRC_102_C	GG	AG	AC	CC
SRC_103_M	GA	AA	AA	TT
SRC_103_C	GG	AG	AC	CT
SRC_104_M	AA	AA	AC	CC
SRC_104_C	AA	AG	AC	CC
SRC_105_M	GA	AG	AA	CC
SRC_105_C	GG	AG	AC	CC
SRC_106_M	GG	AA	AA	TT
SRC_106_C	GA	AG	AA	CT
SRC_107_M	GG	AG	AC	CC
SRC_107_C	GG	AG	AC	CC
SRC_108_M	GG	GG	CC	CC
SRC_108_C	GG	GG	AC	CT
SRC_109_M	GG	AG	AC	CC
SRC_109_C	GG	GG	CC	CC
SRC_110_M	GG	AG	AA	CT
SRC_110_C	GA	AA	AA	CT
SRC_111_M	GG	AA	AC	CT
SRC_111_C	GG	AA	AA	CT
SRC_112_M	AA	GG	AA	TT
SRC_112_C	AA	AG	AA	CT
SRC_113_M	GG	GG	AA	CC

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

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

2. Rezultati genotipizacije KS

KS	MTHFD1 rs2236225 1598 G>A	MTRR rs1801394 66 A>G	MTHFR rs1801131 1298 A>C	MTHFR rs1801133 677 C>T
KS_001_C	AA	GA	CA	CC
KS_001_M	AA	AA	CC	CC
KS_002_C	AA	GA	CA	CC
KS_002_M	GA	AA	CA	CT
KS_003_C	GG	AA	CA	CC
KS_003_M	GG	GA	CA	CC
KS_004_C	GA	GG	CA	CC
KS_004_M	GG	GA	AA	CC
KS_005_C	GG	GG	CA	CC
KS_005_M	GG	GG	CA	CT
KS_006_C	GA	GA	AA	TT
KS_006_M	GA	AA	AA	TT
KS_007_C	GA	GA	CA	CC
KS_007_M	GA	GA	AA	CT
KS_008_C	GG	GA	AA	CT
KS_008_M	GG	AA	CA	CC
KS_009_C	GG	GA	AA	CT
KS_009_M	GA	GA	CA	CC
KS_010_C	GA	GA	AA	CT
KS_010_M	GA	GA	AA	CC
KS_011_C	GA	GA	CA	CC
KS_011_M	GA	GA	CA	CT
KS_012_C	GA	GA	AA	CT
KS_012_M	GA	GG	CA	CT
KS_013_C	GA	GA	CA	CC
KS_013_M	GA	GA	CA	CT
KS_014_C	AA	AA	AA	CT
KS_014_M	GA	GA	CA	CC
KS_015_C	GA	GA	CA	CT
KS_015_M	GG	GG	CA	CC
KS_016_C	GA	AA	AA	CT
KS_016_M	GG	GA	AA	TT
KS_017_C	GA	GG	AA	CC
KS_017_M	AA	GG	AA	CC
KS_018_C	GA	GA	AA	CT
KS_018_M	AA	AA	AA	TT
KS_019_C	GG	GG	CA	CT

KS_019_M	GA	GA	CA	CT
KS_020_C	GA	AA	CA	CT
KS_020_M	GA	AA	CA	CC
KS_021_C	GA	GA	AA	TT
KS_021_M	GA	GG	AA	TT
KS_022_C	GA	GA	AA	CT
KS_022_M	GA	GG	AA	TT
KS_023_C	GA	GG	CA	CC
KS_023_M	GA	GA	CA	CC
KS_024_C	GA	GG	CA	CT
KS_024_M	AA	GG	CA	CT
KS_025_C	GA	AA	CA	CT
KS_025_M	AA	AA	CC	CC
KS_026_C	GA	GA	AA	CC
KS_026_M	GG	GG	CA	CC
KS_027_C	GG	GA	CC	CC
KS_027_M	GG	GG	CA	CT
KS_028_C	GG	GA	CA	CT
KS_028_M	GG	GA	CA	CC
KS_029_C	AA	GG	AA	CC
KS_029_M	GA	GG	AA	CC
KS_030_C	AA	GA	AA	CT
KS_030_M	GA	AA	AA	TT
KS_031_C	GA	AA	CA	CT
KS_031_M	AA	GA	AA	TT
KS_032_C	AA	GG	CA	CC
KS_032_M	GA	GG	CA	CC
KS_033_C	GA	GG	AA	CT
KS_033_M	GA	GG	AA	CT
KS_034_C	GA	GG	CA	CC
KS_034_M	GA	GA	CC	CC
KS_035_C	GA	GA	CC	CC
KS_035_M	GA	GA	CC	CC
KS_036_C	AA	GG	AA	CT
KS_036_M	GA	GG	AA	CC
KS_037_C	GA	GG	CA	CC
KS_037_M	GA	GA	AA	CT
KS_038_C	GA	GA	CA	CT
KS_038_M	AA	AA	CA	CT
KS_039_C	GG	GA	AA	CC
KS_039_M	GG	GG	CA	CC
KS_040_C	GA	GA	CA	CT
KS_040_M	GG	GG	AA	TT
KS_041_C	GA	GG	CC	CC

KS_041_M	GA	GA	CC	CC
KS_042_C	AA	GA	AA	CT
KS_042_M	AA	GG	AA	CC
KS_043_C	GG	GA	AA	CT
KS_043_M	GA	GA	AA	CT
KS_044_C	GA	GA	AA	CC
KS_044_M	GA	AA	AA	CC
KS_045_C	GA	GA	CA	CT
KS_045_M	AA	AA	CA	CT
KS_046_C	GA	GG	CA	CC
KS_046_M	GG	GG	CA	CC
KS_047_C	AA	GG	CA	CT
KS_047_M	AA	GA	CA	CT
KS_048_C	GG	GA	AA	TT
KS_048_M	GA	AA	AA	TT
KS_049_C	GG	GA	CA	CC
KS_049_M	GA	GG	CC	CC
KS_050_C	GA	AA	AA	CT
KS_050_M	AA	GA	AA	CC
KS_051_C	GG	GA	AA	CT
KS_051_M	GA	GA	AA	CT
KS_052_C	GG	AA	CA	CC
KS_052_M	GG	GA	CA	CC
KS_053_C	GA	AA	AA	TT
KS_053_M	GA	GA	AA	CT
KS_054_C	GA	GA	CA	CC
KS_054_M	GA	AA	CC	CC
KS_055_C	GA	GA	AA	TT
KS_055_M	GA	AA	AA	CT
KS_056_C	GA	GA	CA	CC
KS_056_M	GG	GG	CA	CT
KS_057_C	GG	GA	AA	CC
KS_057_M	GA	GG	CA	CC
KS_058_C	GG	GA	AA	CT
KS_058_M	GG	GA	AA	CC
KS_059_C	GA	GA	CA	CT
KS_059_M	GG	GG	CC	CC
KS_060_C	AA	GG	CA	CT
KS_060_M	GA	GG	CA	CC
KS_061_C	AA	GA	AA	CT
KS_061_M	GA	GA	AA	CT
KS_062_C	GA	GA	CA	CC
KS_062_M	GA	GA	AA	CC
KS_063_C	AA	GA	CC	CC

KS_063_M	AA	AA	CA	CC
KS_064_C	GA	GA	CA	CT
KS_064_M	GA	GA	CA	CT
KS_065_C	GA	GG	CA	CC
KS_065_M	GG	GA	CC	CC
KS_066_C	GG	AA	AA	CT
KS_066_M	GG	AA	AA	TT
KS_067_C	GG	GG	AA	CT
KS_067_M	GG	GA	AA	CT
KS_068_C	AA	GA	CA	CC
KS_068_M	AA	GA	CA	CC
KS_069_C	GA	AA	AA	CT
KS_069_M	GG	AA	AA	CT
KS_070_C	GG	GA	AA	CT
KS_070_M	GG	GA	AA	CT
KS_071_C	GA	GG	AA	CT
KS_071_M	GG	GA	AA	CT
KS_072_C	GG	GA	CA	CT
KS_072_M	GG	GG	CA	CT
KS_073_C	GG	GA	CA	CT
KS_073_M	GG	GA	AA	TT
KS_074_C	GA	GA	CC	CC
KS_074_M	AA	GA	CC	CC
KS_075_C	GG	GA	AA	CT
KS_075_M	GG	GA	AA	CT
KS_076_C	GG	GA	AA	CT
KS_076_M	GA	GG	CA	CT
KS_077_C	GA	GA	CA	CC
KS_077_M	GA	GG	CA	CC
KS_078_C	GG	GA	CC	CC
KS_078_M	GG	GA	CC	CC
KS_079_C	GG	AA	CA	CT
KS_079_M	GG	AA	CC	CC
KS_080_C	GG	AA	CA	CC
KS_080_M	GG	GA	AA	CC
KS_081_C	GG	GG	AA	CC
KS_081_M	GA	GA	AA	CT
KS_082_C	GG	GG	AA	CT
KS_082_M	GA	GA	AA	CT
KS_083_C	AA	GG	CA	CC
KS_083_M	GA	GA	AA	CC
KS_084_C	GA	GA	AA	CT
KS_084_M	AA	AA	AA	TT
KS_085_C	GG	GG	CC	CC

KS_085_M	GA	GA	CA	CT
KS_086_C	AA	GG	AA	CT
KS_086_M	GA	GG	AA	CT
KS_087_C	GG	AA	AA	CT
KS_087_M	GA	GA	AA	CC
KS_088_C	GA	AA	CA	CC
KS_088_M	GG	GA	CA	CC
KS_089_C	GA	GA	AA	TT
KS_089_M	GA	GA	CA	CT
KS_090_C	GA	GA	CC	CC
KS_090_M	GA	AA	CC	CC
KS_091_C	GA	GG	CA	CT
KS_091_M	AA	GG	AA	CT
KS_092_C	AA	GA	CA	CT
KS_092_M	GA	GG	CC	CC
KS_093_C	GA	GG	AA	CT
KS_093_M	GA	GG	AA	CT
KS_094_C	AA	GG	AA	TT
KS_094_M	AA	GG	AA	TT
KS_095_C	GA	GA	AA	CT
KS_095_M	GA	GA	AA	CC
KS_096_C	GA	GG	AA	CT
KS_096_M	GA	GA	AA	CT
KS_097_C	GA	GG	AA	CC
KS_097_M	GA	GA	AA	CT
KS_098_C	GA	GA	AA	CT
KS_098_M	GA	GA	CA	CC
KS_099_C	GA	GG	CC	CC
KS_099_M	GG	GA	CA	CC
KS_100_C	GA	GA	AA	TT
KS_100_M	GA	GA	AA	TT
KS_101_C	GA	GA	CA	CT
KS_101_M	GA	AA	CA	CT
KS_102_C	GA	GA	CC	CC
KS_102_M	GA	GA	CC	CC
KS_103_C	GG	GG	CA	CC
KS_103_M	GA	GA	CA	CC
KS_104_C	GG	GA	AA	CT
KS_104_M	GG	GA	AA	CC
KS_105_C	AA	GA	CA	CC
KS_105_M	AA	GA	AA	CC
KS_106_C	GA	GG	AA	CT
KS_106_M	GG	GG	AA	CC
KS_107_C	GA	GA	AA	CT

KS_107_M	GG	GG	AA	CT
KS_108_C	AA	GA	CA	CC
KS_108_M	AA	GG	CA	CT
KS_109_C	GA	AA	AA	TT
KS_109_M	GG	GA	CA	CT
KS_110_C	AA	GA	CC	CC
KS_110_M	GA	GG	CA	CC
KS_111_C	GA	GA	CA	CT
KS_111_M	GG	GG	AA	TT
KS_112_C	GA	GG	CC	CC
KS_112_M	AA	GG	CA	CC
KS_113_C	GA	GA	CA	CT
KS_113_M	GG	GA	AA	CT
KS_114_C	GA	GA	AA	CT
KS_114_M	GG	GA	AA	CC
KS_115_C	GG	GA	AA	CC
KS_115_M	GG	GA	AA	CC
KS_116_C	GA	GA	CA	CC
KS_116_M	GG	GA	CA	CC
KS_117_C	GA	GG	AA	CT
KS_117_M	GA	GA	AA	CT
KS_118_C	GA	GA	CA	CC
KS_118_M	GA	GA	CA	CC
KS_119_C	GA	GA	CA	CT
KS_119_M	AA	GA	AA	CT
KS_120_C	GA	GA	CA	CC
KS_120_M	GA	GA	AA	CC
KS_121_C	GG	GA	CA	CT
KS_121_M	GG	AA	CA	CT
KS_122_C	AA	GA	CA	CT
KS_122_M	GA	GA	CA	CT
KS_123_C	GA	GG	CA	CC
KS_123_M	GA	GA	CC	CC
KS_124_C	GA	GG	AA	CT
KS_124_M	GG	GG	AA	CT
KS_125_C	GA	GA	AA	CT
KS_125_M	GA	GG	AA	CC
KS_126_C	GA	GA	CC	CC
KS_126_M	GA	GA	CA	CT
KS_127_C	AA	GA	AA	CT
KS_127_M	AA	GA	AA	CC
KS_128_C	GA	AA	AA	CT
KS_128_M	GA	AA	AA	CT
KS_129_C	GA	GG	AA	CT

KS_129_M	GG	GA	AA	TT
KS_130_C	AA	GA	CA	CT
KS_130_M	GA	GA	AA	TT
KS_131_C	GG	GG	CA	CT
KS_131_M	GG	GG	CA	CT
KS_132_C	GG	GA	AA	CC
KS_132_M	GA	GA	AA	CC
KS_133_C	AA	AA	AA	TT
KS_133_M	GA	GA	AA	CT
KS_134_C	GG	GA	CA	CT
KS_134_M	GA	GA	AA	CT
KS_135_C	GA	GA	AA	CT
KS_135_M	GG	AA	AA	TT
KS_136_C	GG	GA	AA	CC
KS_136_M	GA	GA	CA	CC
KS_137_C	GA	GA	CA	CT
KS_137_M	GG	GA	AA	TT
KS_138_C	GG	GA	CA	CT
KS_138_M	GG	GA	CA	CT
KS_139_C	GA	GG	CA	CT
KS_139_M	GA	GA	CA	CT
KS_140_C	GA	GG	AA	TT
KS_140_M	GG	GA	CA	CT
KS_141_C	GA	GA	CA	CC
KS_141_M	GA	GA	CA	CT
KS_142_C	AA	AA	AA	CT
KS_142_M	AA	AA	CA	CC
KS_143_C	GA	GA	AA	CT
KS_143_M	GG	GG	CA	CC
KS_144_C	GA	GG	CC	CC
KS_144_M	GA	GG	CA	CC
KS_145_C	AA	GA	AA	CT
KS_145_M	AA	GG	AA	CT
KS_146_C	GA	GG	CA	CT
KS_146_M	GA	GG	CA	CT
KS_147_C	GA	AA	CC	CC
KS_147_M	GG	GA	CA	CC
KS_148_C	GA	GG	AA	CT
KS_148_M	GA	GA	AA	TT
KS_150_C	GA	GA	AA	CT
KS_150_M	AA	GA	AA	CT
KS_151_C	GA	GA	AA	CT
KS_151_M	GG	AA	AA	CT
KS_152_C	GA	GG	CA	CT

KS_152_M	GA	GA	CC	CC
KS_153_C	GG	GA	AA	TT
KS_153_M	GA	GG	AA	TT
KS_154_C	GA	GG	AA	CC
KS_154_M	GA	GG	AA	CC
KS_155_C	GA	AA	CC	CC
KS_155_M	GG	GA	CC	CC
KS_156_C	GA	GA	AA	CC
KS_156_M	GG	AA	CA	CC
KS_157_C	GA	AA	CA	CC
KS_157_M	GA	GA	CA	CT
KS_158_C	GA	GA	AA	CT
KS_158_M	GA	GG	AA	CC
KS_159_C	AA	GG	AA	CT
KS_159_M	AA	GG	AA	CC
KS_160_C	GG	GA	CA	CT
KS_160_M	GG	GG	AA	CT
KS_161_C	GA	GA	CC	CC
KS_161_M	GA	GA	CA	CT
KS_162_C	AA	AA	AA	CT
KS_162_M	AA	GA	AA	CC
KS_163_C	GG	GA	CC	CC
KS_163_M	GG	GA	CA	CC
KS_164_C	GG	AA	AA	TT
KS_164_M	GG	GA	AA	TT
KS_165_C	AA	AA	AA	CC
KS_165_M	GA	AA	CA	CC
KS_166_C	GA	GG	AA	TT
KS_166_M	AA	GG	AA	CT
KS_167_C	AA	GG	AA	CT
KS_167_M	GA	GG	AA	CT
KS_168_C	GG	AA	CA	CC
KS_168_M	GG	GA	CA	CC
KS_169_C	GG	GA	CA	CT
KS_169_M	GG	AA	AA	CT
KS_170_C	AA	GG	CA	CC
KS_170_M	AA	GG	AA	CT
KS_171_C	GG	GA	CA	CC
KS_171_M	GG	GG	AA	CT
KS_172_C	GG	GA	CC	CC
KS_172_M	GA	AA	CA	CT
KS_173_C	GA	GA	CA	CC
KS_173_M	GA	GA	CC	CC
KS_174_C	GA	AA	AA	CC

KS_174_M	GG	GA	AA	CT
KS_175_C	AA	GG	AA	CT
KS_175_M	GA	GG	CA	CT
KS_176_C	GG	GA	CA	CC
KS_176_M	GG	GG	CC	CC
KS_177_C	GA	GA	CA	CC
KS_177_M	GG	GG	CC	CC
KS_178_C	AA	GA	AA	TT
KS_178_M	AA	GA	AA	CT
KS_179_C	AA	GA	AA	CT
KS_179_M	GA	GG	AA	TT
KS_180_C	GA	AA	CA	CC
KS_180_M	GA	GA	AA	CC
KS_181_C	GG	GA	CA	CC
KS_181_M	GA	GG	CA	CC
KS_182_C	GA	GG	CA	CC
KS_182_M	GA	GA	CC	CC
KS_183_C	GA	GA	AA	TT
KS_183_M	GG	GG	CA	CT
KS_184_C	GA	GA	CA	CC
KS_184_M	AA	GG	AA	CC
KS_185_C	GG	GA	CC	CC
KS_185_M	GG	GA	CA	CC
KS_186_C	GG	GA	AA	TT
KS_186_M	GG	AA	AA	CT
KS_187_C	GG	GG	AA	CT
KS_187_M	GA	GA	AA	CT
KS_188_C	GG	GG	CA	CC
KS_188_M	GA	GG	CA	CT
KS_189_C	GA	GA	CA	CT
KS_189_M	GG	GG	CA	CC
KS_190_C	GA	GA	CA	CC
KS_190_M	AA	GG	CC	CC
KS_191_C	GG	GG	CC	CC
KS_191_M	GG	GG	CC	CC
KS_192_C	GA	GG	CA	CT
KS_192_M	GA	GA	CA	CT
KS_193_C	GA	GA	AA	CC
KS_193_M	AA	GG	AA	CC
KS_194_C	GA	GG	CA	CC
KS_194_M	GA	GA	AA	CT
KS_195_C	GA	AA	AA	CT
KS_195_M	GA	AA	AA	CT
KS_196_C	GG	AA	AA	CT

KS_196_M	GG	GA	CA	CC
KS_197_C	AA	GA	CA	CC
KS_197_M	AA	GG	CA	CC
KS_198_C	GG	GG	AA	CT
KS_198_M	GA	GG	AA	CT
KS_199_C	GA	GA	AA	TT
KS_199_M	AA	GG	AA	TT
KS_200_C	GA	GG	CC	CC
KS_200_M	GG	GG	CA	CT

3. Anketni vprašalnik za mame

Vprašalnik 1 - vse preiskovanke

Ime in Priimek oz. šifra preiskovanke _____

Datum: _____

Datum rojstva: _____

1. Označite ustrezno polje:

Trenutno sem noseča, predvideni datum poroda: _____.

Dojim

Ne dojim

2. Demografski podatki

a. Število nosečnosti (če ste trenutno noseči, napišite število nosečnosti pred to nosečnostjo): _____

b. Število živorojenih otrok: _____

c. Število spontanih splavov: _____

d. Telesna višina (cm): _____ Telesna teža (kg): _____

e. Ali imate otroka z (ustrezno označite):

Napako nevralne cevi

Prirojeno srčno okvaro

Orofacilano shizo

Kakšno drugo prirojeno napako: _____

Nič od navedenega

f. Ali se je v vaši družini že rodil otrok z eno izmed prirojenih motenj navedenih v prejšnji točki?

Da Ne

Če ste odgovorili z da, za katero izmed motenj je šlo: _____

Vaše sorodstveno razmerje s prizadetim otrokom: _____

g. Kadilski status:

Kadim

Ne kadim:

Nikoli nisem kadila

Sem bivši kadilec, ne kadim že _____

h. Stopnja izobrazbe:

Osnovna šola

Srednja poklicna šola

Gimnazija

Višja šola

Univerzitetna izobrazba

Magisterij ali doktorat

n. Ali ste poleg pripravkov folne kisline pred in med nosečnostjo jemali še kakšne (multi)vitaminske pripravke? Da Ne

Če da,

katere: _____

o. Ali ste kdaj imeli umetno prekinitvev nosečnosti zaradi okvare ploda? Da Ne

Za kakšno vrsto okvare je šlo: _____

p. Ali ste kdaj rodili otroka z okvaro nevroalne cevi? Da Ne

r. Ali ste kdaj rodili otroka s srčno okvaro? Da Ne

s. Ali ste kdaj rodili otroka z orofacialno shizo? Da Ne

t. Na lestvici od 1 do 5 označite, kako podobna je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo vaši sedanji prehrani (1-popolnoma različna, 5-praktično enaka):

1 2 3 4 5

Vprašalnik 3 – Samo preiskovanke DS 7 – matere otrok z okvaro nevroalne cevi / srčno ovaro / orofacialno shizo

3. Vprašanja se nanašajo na nosečnost v kateri ste rodili otroka z okvaro nevroalne cevi / srčno ovaro / orofacialno shizo:

a. Telesna teža pred zanositvijo (kg): _____

b. Spol otroka: Moški Ženski

c. Sladkorna bolezen pred nosečnostjo: Da Ne

d. Nosečniška sladkorna bolezen: Da Ne

e. Ali imate katero drugo kronično bolezen: Da Ne Če da, katero:

f. Ali ste med nosečnostjo uporabljali zdravila za zdravljenje epilepsije? Da Ne

g. Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila? Da Ne Če da, napišite katera:

h. Ali ste imeli kdaj v prvem trimestrju nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38°C?

Da Ne

i. Ali ste v prvem trimestru nosečnosti uporabljali savno? Da Ne

j. Ali ste pred zanositvijo jemali folno kislino? Da Ne

Če da, kateri pripravek oz. pripravke: _____

k. Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali folno kislino? Da Ne

Če da, kateri pripravek oz. pripravke: _____

l. Kdaj ste začeli jemati folno kislino:

- Pred izostankom menstruacije
 Takoj po izostanku menstruacije
 Več kot 1 teden po izostanku menstruacije

m. Ali ste folno kislino jemali redno (vsak dan)?

- Da
 Ne, občasno sem pozabila vzeti tabletko
 Ne, ker mi je bilo po tabletah slabo

n. Ali ste poleg pripravkov folne kisline pred in med nosečnostjo jemali še kakšne (multi)vitaminske pripravke? Da Ne

Če da, katere: _____

o. Ali ste kdaj imeli umetno prekinitvev nosečnosti zaradi okvare ploda? Da Ne

Za kakšno vrsto okvare je šlo: _____

p. Ali ste kdaj rodili otroka z okvaro nevralne cevi? Da Ne

r. Ali ste kdaj rodili otroka s srčno okvaro? Da Ne

s. Ali ste kdaj rodili otroka z orofacialno shizo? Da Ne

t. Na lestvici od 1 do 5 označite, kako podobna je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo vaši sedanji prehrani (1-popolnoma različna, 5-praktično enaka):

1 2 3 4 5

Vprašalnik 4 - vse preiskovanke – Prehrana v zadnjih 4 tednih

Označite, kako pogosto ste v zadnjih 4 tednih uživali določena živila:

4. Mleko in mlečni izdelki

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Mleko									
Jogurt									

Sir									
Parmezan									

5. Sadje in sadni sokovi

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Pomarančni sok									
Sok grenivke									
Pomaranče									
Grenivke									
Banane									
Ananas									
Melone									
Jagode									
Maline									

6. Zelenjava

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Koruza									
Grah									
Paradižniki									
Paradižnikov sok									
Paradižnikova omaka									
Brokoli									
Špinača									
Koleraba									
Zelena solata									
Šparglji									
Leča									
Redkvice									
Brstični ohrovt									
Kitajsko zelje									

7. Žitarice, stročnice in oreški

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Fižol									
Riž									
Sezam (semena, olje, tahini omaka)									
Brazilski oreški									
Soja (tudi sojina omaka)									
Pšenični kalčki									

Oves (kosmiči, piškoti)									
Arašidi									
Čičerika									
Mandlji									
Sončnična semena									
Kruh (vse vrste)									

8. Meso

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Ribe									
Tuna									
Piščanec									
Svinjina									
Slanina									
Govedina									
Jetra									
Školjke									

9. Ostalo

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Jajca (cela)									
Rumenjak									
Beljak									
Pivo									

10. Prehranska dopolnila

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili prehransko dopolnilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Multivitaminska prehranska dopolnila									
Pripravki folne kisline									
Pripravki, ki vsebujejo vitamine B kompleksa									