

# Polimorfizmi gena uključenih u metabolizam folata kao rizični čimbenici trisomije 21

---

Vraneković, Jadranka

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:402444>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Jadranka Vraneković

POLIMORFIZMI GENA UKLJUČENIH U METABOLIZAM FOLATA KAO RIZIČNI  
ČIMBENICI TRISOMIJE 21

Doktorski rad

Rijeka, 2012.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Jadranka Vraneković

POLIMORFIZMI GENA UKLJUČENIH U METABOLIZAM FOLATA KAO RIZIČNI  
ČIMBENICI TRISOMIJE 21

Doktorski rad

Rijeka, 2012.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Bojana Brajenović-Milić

Doktorski rad obranjen je dana 10. svibnja 2012. na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Blaženka Grahovac
2. prof.dr.sc. Borut Peterlin
3. prof.dr.sc. Oleg Petrović
4. prof.dr.sc. Bojana Brajenović-Milić

Rad ima 115 listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## *Zahvala*

*Profesorici dr.sc. Bojani Brajenović-Milić, svojoj mentorici, dugujem veliku zahvalnost na savjetima i vodstvu tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala pročelniku Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku prof.dr.sc. Miljenku Kapoviću na podršci od prvog dana mog dolaska na Zavod.*

*Zahvalnost dugujem i doc.dr.sc. Grubić, doc.dr.sc. Wagner, dr.sc. Dahoun koje su mi omogućile da učim i radim u njihovim laboratorijima.*

*Veliko hvala svim mojim kolegicama i kolegama te tehničarkama Davorki, Goranki, Željki, Ivani i Azemini bez čije suradnje ovaj rad ne bi bilo moguće ostvariti.*

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

*Uspješan završetak mog rada bio bi nezamisliv bez razumjevanja i pomoći moje obitelji .*

## SAŽETAK

**Cilj** ovog istraživanja bio je utvrditi predstavljaju li polimorfizmi gena *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G, pojedinačno ili u kombinaciji, rizične čimbenike za nerazdvajanje kromosoma 21 u majki djece s DS-om i to s obzirom na starosnu dob, mejotičku diobu te broj i položaj rekombinacije.

**Ispitanici i metode:** U istraživanju je sudjelovalo 116 obitelji od kojih je 76 bilo tročlanih (majka, otac i dijete s DS) i 40 dvočlanih (majka i dijete s DS). U svim slučajevima DS-a (N=116) radilo se o regularnom tipu trisomije 21. Kontrolnu grupu majki (N=141) i očeva (N=101) činile su osobe koje su imale zdravu djecu i urednu obiteljsku i osobnu anamnezu. Ispitanici i kontrole usklađeni su po dobi. Za određivanje roditeljskog podrijetla trisomije 21, mejotičke diobe te broja i položaja rekombinacije koristila se PCR-STR metoda. Genotipizacija polimorfizama *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G je izvedena PCR-RFLP metodom. Za usporedbu učestalosti alela i genotipova koristio se  $\chi^2$  test i Fisherov egzaktni test. Procjena rizika alela, genotipova i njihovih kombinacija za trisomiju 21 temeljila se na omjeru izgleda i pripadajućeg 95% raspona pouzdanosti. Povezanost pojedinačnih polimorfizama s nerazdvajanjem kromosoma u MI i MII diobi te brojem i položajem rekombinacija testirala se Spearmanovim rank korelacijskim testom. Statistička značajnost određivana je na razini  $p < 0,05$ .

**Rezultati:** Od ukupno 116 obitelji u 102 (88%) je uspješno određeno podrijetlo DS-a. Majčino podrijetlo trisomija 21 utvrđeno je u 93% slučajeva i znatno su češće nastale kao posljedica nerazdvajanja kromosoma u MI (86%) nego u MII diobi (14%). Očevo podrijetlo utvrđeno je u 5%, a postzigotno u 2% slučajeva DS-a. Majke djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla starije su od majki djece s DS-om očevog i/ili postzigotnog podrijetla ( $P=0,010$ ). U trisomija 21 majčinog podrijetla nastalih nerazdvajanjem kromosoma u MI diobi izostanak rekombinacije utvrđen je u 79%, jedna rekombinacija u 18%, a dvije rekombinacije u 3% slučajeva. U slučajevima s utvrđenom samo jednom rekombinacijom ona je najčešće smještena u distalnom dijelu kromosoma (60%). U trisomija 21 nastalih nerazdvajanjem kromosoma u MII diobi utvrđen je pericentromerni položaj rekombinacije u svim slučajevima s jednom rekombinacijom. Učestalost broja i položaja rekombinacija u MI i MII diobi nije se statistički značajno razlikovala

ovisno o dobnoj skupini majki djece s DS-om. Učestalost alela i genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama, pojedinačno ili u kombinaciji, nije se statistički značajno razlikovala između ispitivanih skupina majki. Razlike nisu utvrđene ni obzirom na starosnu dob majke, mejotičku diobu, broj i položaj rekombinacija. U očeva djece s DS-om utvrđena je statistički značajno manja učestalost *MTHFR* 1298CC genotipa u odnosu na grupu kontrolnih očeva ( $P = 0,029$ ). Učestalost ostalih genotipova i alela *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama nije se statistički značajno razlikovala između očeva djece s DS-om i kontrolne grupe.

**Zaključak:** Rezultati našeg istraživanja pokazali su da *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizmi, pojedinačno ili u kombinaciji, ne predstavljaju rizične čimbenike majke za trisomiju 21 majčinog podrijetla. Istovremeno, promijenjen obrazac rekombinacije potvrđen je kao rizični čimbenik nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom mejoze, ali nije dokazana povezanost s prisustvom ispitivanih polimorfizama.

**Ključne riječi:**

Down sindrom; Genetička rekombinacija; Genski polimorfizam; Kromosomsko nerazdvajanje; Metilentetrahidrofolat-reduktaza; Metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza; Trisomija 21.

## ABSTRACT

### Polymorphisms of genes involved in folate metabolism as risk factors for trisomy 21

**Aim:** This study aimed to determine whether polymorphisms of *MTHFR* C677T/A1298C and *MTRR* A66G genes, individually or in combination, represented risk factors for the nondisjunction of chromosome 21 in mothers of children with Down Syndrome (DS), considering age, meiotic division, and the numbers and locations of recombinations.

**Patients and methods:** The study included 116 families; 76 were three-member families (mother, father, and child with DS), and 40 were two-member families (mother and child with DS). All DS cases (N = 116) exhibited full trisomy 21. A control group of mothers (N = 141) and fathers (N = 101) consisted of individuals that had a healthy child and no personal or family history of trisomy 21. Subjects and controls were age-matched. PCR genotyping with short tandem repeats was used to determine the parental origin of trisomy 21, meiotic division stage, and the numbers and locations of recombinations. PCR with restriction fragment length polymorphisms was performed to detect *MTHFR* C677T/A1298C and *MTRR* A66G polymorphisms. The frequencies of alleles and genotypes were compared between groups with the  $\chi^2$  and Fisher's exact tests. Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated to evaluate the allele/genotype risk for trisomy 21. The Spearman rank correlation test was used to test whether individual polymorphisms were associated with chromosome nondisjunctions in meiotic MI and MII divisions or with the numbers and locations of recombinations. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

**Results:** The parental origin of DS was successfully determined in 102 (80%) out of 116 families. Maternal origin of trisomy 21 was found in 93% of cases and was caused by chromosome nondisjunction in the MI (86%) more often than in the MII (14%) division. Paternal origin was found in 5% of cases; mitotic origin occurred in 2% of cases. Mothers of children with trisomy 21 of maternal origin were older than mothers of children with DS of paternal and/or mitotic origin ( $P = 0.010$ ). In trisomy 21 of maternal origin that resulted from chromosome nondisjunction in the MI division, no recombinations occurred in 79%, one recombination occurred in



18%, and two recombinations occurred in 3% of cases. In cases with a single recombination event, recombination was most commonly located in the distal part of the chromosome (60%). In trisomy 21 caused by chromosome nondisjunction in the MII division, a pericentromeric recombination location was established in all cases with a single recombination event. The frequency distributions of the numbers and locations of recombinations in MI and MII divisions were not significantly different among the different maternal age groups (young  $\leq 36$ ; older  $>36$ ). No significant differences were found between case and control groups in the frequency of alleles, genotypes, or genotype combinations of the *MTHFR* C677T/A1298C and *MTRR* A66G polymorphisms. Additionally, no significant differences were found in the frequency of alleles, genotypes, or genotype combination in case group of mothers according to maternal age, meiotic division, or the numbers and locations of recombinations. Fathers of children with DS showed significantly lower frequencies of the *MTHFR* 1298CC genotype compared to the control group of fathers ( $P = 0.029$ ). The frequency distribution of other genotypes and alleles with *MTHFR* C677T/A1298C and *MTRR* A66G polymorphisms was not statistically significantly different between the fathers of children with DS and the control group of fathers.

**Conclusion:** Our findings showed that the *MTHFR* C677T/A1298C and *MTRR* A66G polymorphisms, individually or in combination, did not represent risk factors for maternal trisomy 21. Although we confirmed that altered recombination was a risk factor for improper separation of chromosomes during meiosis, we did not find an association with the presence of the investigated polymorphisms.

**Keywords:** Down Syndrome; Methylenetetrahydrofolate reductase; Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase; Nondisjunction; Genetic, Polymorphism; Genetic, Recombination; Genetic, Trisomy 21.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1. 1. Genetika sindroma Down .....	2
1.2. Etiologija sindroma Down.....	3
1.2.1. Starosna dob majke kao rizični čimbenik trisomije 21.....	4
1.2.2. Rekombinacija .....	5
1.3. Metabolizam folata/homocisteina .....	7
1.3.1. Polimorfizmi gena metilentetrahidrofolat-reduktaze .....	10
1.3.1.1. <i>MTHFR</i> C677T polimorfizam.....	11
1.3.1.2. <i>MTHFR</i> A1298C polimorfizam .....	12
1.3.1.3. <i>MTHFR</i> C677T i A1298C polimorfizmi kao rizični čimbenici za DS .....	13
1.3.2. Polimorfizam gena 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza..	15
1.3.2.1. <i>MTRR</i> A66G polimorfizam kao rizični čimbenik za DS .....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
3. ISPITANICI I METODE .....	20
3.1. Ispitanici.....	20
3.2 Metode.....	22
3.2.1. Izolacija genomske DNA i određivanje koncentracije i čistoće DNA .....	22
3.2.2. Metoda lančane reakcije polimerazom i restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (PCR – RFLP metoda).....	22
3.2.2.1. Analiza <i>MTHFR</i> C677T i A1298C polimorfizama.....	23
3.2.2.2. Analiza <i>MTRR</i> A66G polimorfizma.....	25
3.2.3. Analiza kratkih ponavljajućih sljedova .....	26

3.2.3.1. PCR-STR i gel elektroforeza .....	27
3.2.3.2. PCR-STR i elektroforeza DNA u automatskom laser sekvenceru.....	29
3.2.3.3. QF-PCR i kapilarna elektroforeza.....	31
3.2.4. Određivanje podrijetla trisomije 21 .....	33
3.2.5. Analiza rekombinacija .....	35
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	36
4. REZULTATI .....	38
4.1. Podrijetlo trisomije 21 .....	40
4.2. <i>MTHFR</i> C677T/A1298C i <i>MTRR</i> A66G polimorfizmi i trisomija 21 .....	42
4.2.1. <i>MTHFR</i> C677T/A1298C i <i>MTRR</i> A66G polimorfizmi u odnosu na starosnu dob majke.....	49
4.3. Analiza rekombinacije .....	55
4.3.1. Rekombinacija i starosna dob majke.....	57
4.4. <i>MTHFR</i> C677T/A1298C, <i>MTRR</i> A66G polimorfizmi, dioba nerazdvajanja kromosoma 21, broj i položaj rekombinacije.....	59
4.5. Analiza polimorfizama <i>MTHFR</i> C677T/A1298C i <i>MTRR</i> A66G u očeva djece s DS..	71
5. RASPRAVA .....	74
6. ZAKLJUČCI .....	93
7. LITERATURA .....	95
8. POPIS SKRAĆENICA.....	110
9. ŽIVOTOPIS.....	111

## 1. UVOD

Down sindrom (DS) je najčešći uzrok mentalne retardacije u čovjeka, a nastaje kao posljedica kromosomske aberacije, odnosno trisomije 21(1). Prema najnovijim podacima EUROCAT mreže registara za epidemiologijsko praćenje kongenitalnih anomalija u Europi, prevalencija DS-a iznosi 1/1000 živorođene djece, i u gotovo 50% slučajeva majke djece rođene s DS-om stare su 35 i više godina (2). Hrvatska je uključena u EUROCAT-ovu mrežu s jednim registrom sa sjedištem u Zagrebu koji pokriva 12% naše zemlje i prikuplja podatke iz Zagreba, Rijeke, Pule i Varaždina. Prevalencija DS-a u Hrvatskoj za razdoblje 1980. - 2009. godine iznosi 1,1/1000 živorođenih godišnje (3). Općenito, prevalencija DS-a u živorođenih uvjetovana je s nekoliko čimbenika kao što su mogućnost prekida trudnoće u slučajevima fetalnih abnormalnosti, primjena prenatalnih testova probira za DS i trend rađanja u kasnijoj životnoj dobi. U zemljama gdje zakonom nije dozvoljen prekid trudnoće zbog fetalnih abnormalnosti kao što su npr. Irska, Malta i Poljska, prevalencija DS-a je vrlo visoka i iznosi oko 2/1000 živorođenih (2).

Kliničku sliku DS-a prvi je put opisao Lagdon Down 1866. godine. Pored karakteristične kraniofacijalne dismorfije i mentalne retardacije, osobe koje boluju od DS-a često imaju prirođene srčane mane (40%) i malformacije unutarnjih organa, najčešće bubrega i crijeva (12%). Nerijetko boluju i od akutne mijeloidne leukemije, Hirschsprungove bolesti kao i bolesti štitnjače, te imaju smanjenu otpornost prema infekcijama. Nasuprot tome, incidencija solidnih tumora u osoba s DS-om znatno je manja nego što je to slučaj u općoj populaciji. Osobe s DS-om starije od 40 godina pate od presenilne demencije tipa Alzheimer (4-6). Uzroci varijabilnog fenotipa uočenog kod osoba s DS-om još su uvijek nedovoljno poznati

i predmet su istraživanja mnogih znanstvenika. Geni kandidati odgovorni za fenotipske karakteristike DS-a nalaze se upravo na 21. kromosomu. Većina gena smještena je u području 21q22.1-22.3 u tzv. Down sindrom kritičnoj regiji (engl. Down syndrome critical region – DSCR) (7- 10).

Tri kopije kromosoma 21 u osoba s DS-om rezultiraju povećanom ekspresijom gena kandidata koji imaju 1,5 puta veću dozu genskog produkta u različitim tkivima i razvojnim stadijima u odnosu na euploidne kontrole (9,11). Smatra se da neravnoteža u ekspresiji gena kromosoma 21 i gena ostalih kromosoma dovodi do karakterističnog fenotipa DS-a (12). Također i epigenetičke promjene mogu različito djelovati na fenotip DS-a (13). Dio istraživanja vezanih za DS usmjeren je k otkrivanju gena kromosoma 21, koji kada su prisutni u tri kopije, dovode do određenog fenotipa te tako njihova povećana ekspresija utječe na molekularne, stanične i fiziološke promjene (12,14,15).

### **1. 1. Genetika sindroma Down**

Jerome Lejeune je 1959. godine otkrio da je trisomija 21. kromosoma uzrok DS-a (16). U gotovo 95% slučajeva radi se o slobodnoj trisomiji, odnosno o regularnom tipu DS-a. Ovaj tip trisomije 21 nastaje kao posljedica nerazdvajanja kromosoma tijekom gametogeneze i to najčešće tijekom oogeneze (90 - 95%), a rjeđe tijekom spermatogeneze (4 - 10%). Nepravilno razdvajanje češće se događa u prvoj mejotičkoj diobi (MI) (76%) nego u drugoj mejotičkoj diobi (MII) oogeneze (24%). Učestalost nerazdvajanja kromosoma u spermatogenezi češća je u MII (68%) nego li u MI diobi (32%). U svega 2 - 3% slučajeva trisomija 21 posljedica je postzigotnog, mitotskog nerazdvajanja kromosoma (17-20). Strukturna promjena kromosoma kao uzrok trisomije 21 javlja se u 4% slučajeva DS-a. Najčešće se

radi o Robertsonovim translokacijama nehomolognog tipa koje uključuju akrocentrične kromosome 14 i 21. Trisomija 21 translokacijskog tipa može biti posljedica svježe mutacije (*de novo*) ili naslijeđena od jednog roditelja. Isto tako i recipročne translokacije koje uključuju kromosom 21 mogu uzrokovati kliničku sliku DS-a. (19,21). Svega 1% osoba s DS-om ima mozaičan kariotip kojeg opisuju dvije stanične linije od kojih je jedna trisomična za 21. kromosom (21).

## 1.2. Etiologija sindroma Down

Starosna dob majke dobro je poznat, ali još uvijek nedovoljno razjašnjen rizični čimbenik za trisomiju 21 (22,23). Još je davne 1933. godine Penrose uočio da starije majke puno češće imaju dijete s DS-om (24). Rizik da će žena mlađa od 30 godina roditi dijete s DS-om je 1 : 1000, dok je u dobi od 35 godina ta vjerojatnost 1:350. U 40-oj godini života majke rizik za DS iznosi 1 : 112 (25). Rekombinacija, odnosno izmjena genetičkog materijala između homolognih kromosoma drugi je često ispitivan rizični čimbenik za trisomiju 21. Pretpostavlja se da su za nastanak trisomije 21 ključna dva događaja, tzv. „two-hit“ model (26). Prvo, u profazi prve mejotičke diobe nastaje tzv. „osjetljiv“ bivalent, a nakon toga dolazi do nepravilnog razdvajanja kromosoma u prvoj ili drugoj mejotičkoj diobi. „Osjetljiv“ bivalent može biti homologni par kromosoma 21 bez mejotičke rekombinacije ili bivalent kod kojeg se desi samo jedna rekombinacija i to u telomernoj ili pericentromernoj regiji. Drugo, „osjetljiv“ bivalent nepravilno se razdvaja uslijed degradacije staničnih proteina koji povezuju kromatide, kao i onih proteina koji su uključeni u građu diobenog vretena (27,28). Rizik za nepravilno razdvajanje kromosoma povećava se sa životnom dobi majke zbog ubrzane

degradacije spomenutih staničnih proteina te promjena u tkivu ovarija uslijed godina akumuliranja različitih negativnih okolišnih utjecaja (29).

### **1.2.1. Starosna dob majke kao rizični čimbenik trisomije 21**

Povezanost između starosne dobi majke i trisomije 21 desetljećima je jedno od važnijih pitanja u medicinskoj genetici (22). Brojnim hipotezama nastoji se objasniti utjecaj godina majke na pojavu trisomije 21 (5,30-32). Jedna od najcitiranijih hipoteza zagovara stav da žene iste kronološke dobi imaju različite biološke godine te da frekvencija trisomičnih trudnoća ovisi upravo o biološkim godinama žene (33). Istraživanja funkcije jajnika (hormoni, količina oocita, diobeno vreteno, mitohindriji) podupiru teoriju o preranom starenju reproduktivnog sustava žene i povećanom riziku za nerazdvajanje kromosoma (33-36).

Istraživanja ovarija namjerno pobačenih plodova otkrila su mozaicizam oocita ovarija, odnosno postojanje oocita s tri kromosoma 21 (37). Autori pretpostavljaju da je većina trudnoća s trisomijom 21 nastala sazrijevanjem upravo tih trisomičnih oocita čija se tri homologna kromosoma 21 razdvajaju tzv. sekundarnim tipom nerazdvajanja. Nadalje, smatraju da trisomične oocite sporije sazrijevaju i da se akumuliraju tijekom godina. Njihovo nasumično sazrijevanje povećava rizik za DS čime se objašnjava povezanost starosne dobi i DS-a. Svoju teoriju nazvali su model selekcije mozaičnih oocita (engl. Oocyte mosaicism selection model – OMS) (38).

Hipoteza o genetičkom starenju zasniva se na molekularnim ispitivanjima dužine telomere. Uočeno je da žene iznad 35 godina koje su rodile dijete s DS-om imaju kraće telomere odnosno da su genetički starije od kontrolne skupine žena iste kronološke dobi. Pretpostavlja se da je genetičko starenje ključan uzrok svih

promjena koje se povezuju sa starosnom dobi žene i promjenama u funkciji jajnika. U grupi ispitanika i kontrole mlađih žena nije uočena statistička značajnost u dužini telomera (39).

Utjecaj životne dobi oca prema dosadašnjim saznanjima ne mijenja značajno rizik za DS te se smatra sekundarnim, iako se ne bi u potpunosti smjelo zanemariti (40-42).

### **1.2.2. Rekombinacija**

Homologna rekombinacija ili izmjena genetičkog materijala odvija se u profazi prve mejotičke diobe. Rekombinacijom se povezuju nesestrinske kromatide homolognih kromosoma te između njih dolazi do *crossing-overa* što doprinosi genetičkoj varijabilnosti. Posljedica *crossing-overa* je hijazma kojom bivalenti ostaju povezani sve do trenutka njihovog razdvajanja (43). Položaj hijazme smatra se jednim od bitnijih čimbenika za pravilno razdvajanje bivalenata. Homologni par kromosoma 21 s hijazmom formiranom u sredini dugog kraka prisutan je u većini euploidnih stanica te se kromosomi pravilno razdvajaju tijekom oogeneze (44). Svaka promjena normalnog položaja rekombinacije predstavlja rizik za nepravilno razdvajanje kromosoma (26). U oko 45% trisomija 21 uočen je potpuni izostanak rekombinacije (45,46). U ostalim slučajevima prisutna je samo jedna rekombinacija i to ili u distalnom ili u proksimalnom dijelu dugog kraka kromosoma 21 (47-49). Povezanost između godina starosti majke i položaja rekombinacije prvi put je uočena u studiji provedenoj na 400 obitelji s DS-om nastalim zbog nerazdvajanja kromosoma u MI diobi oogeneze (47). Autori su zaključili da i pericentromerni kao i telomerni položaj rekombinacije predstavljaju rizični čimbenik za nerazdvajanje kromosoma 21 i to u mlađih majki ( $\leq 29$  godina). S godinama,



postotak „osjetljivih” bivalenata smanjuje se u grupi starijih majki (> 34 godine) i položaj rekombinacije pomiče se prema sredini kromosoma kao kod slučajeva s normalnim razdvajanjem kromosoma. Autori su pretpostavili da postoje rizici za nerazdvajanje koji su ovisni o godinama te oni koji to nisu. Razlog tome nalaze u činjenici što u mlađih majki mejotički mehanizam funkcionira optimalno i korektno razdvaja sve bivalente osim onih koji spadaju u skupinu „osjetljivih” bivalenata, a to su bivalenti bez rekombinacije ili s njom, ali u pericentromernom ili telomernom položaju. S godinama oocita akumulira različite štetne utjecaje iz okoline pa je mejotički mehanizam podložniji greškama u razdvajanju kromosoma. Tako su i „osjetljivi” bivalenti, ali i bivalenti s normalnom konfiguracijom podložni nerazdvajanju (47). Daljnja istraživanja na većem broju ispitanika utvrdila su da je izostanak rekombinacije neovisan događaj o godinama starosti majke te da slučajno utječe na nepravilno razdvajanje kromosoma (48). Isto tako i rekombinacija u distalnom dijelu kromosoma rizični je čimbenik za nerazdvajanje kromosoma neovisan o starosnoj dobi majke (46,48,49). Autori pretpostavljaju da distalno pozicionirana hijazma slabije povezuje homologne kromosome zbog slabije kohezije između sestrinskih kromatida koja inače sprječava nepravilno odvajanje homologa (46). Što se tiče druge mejotičke diobe, utvrđeno je da prisutnost hijazme u pericentromernom dijelu homolognog para kromosoma 21 predstavlja rizik za nerazdvajanje koji je ovisan o godinama i češće je prisutan u grupi starijih majki (48,49). Smatra se da pericentromerni položaj rekombinacije predstavlja suboptimalnu konfiguraciju koja dodatno pojačava rizik za nerazdvajanje vezan za starosnu dob majke te štiti bivalente od efekta starosne dobi majke tako što omogućuje njihovo normalno razdvajanje tijekom prve mejotičke diobe, ali ne i pravilno razdvajanje sestrinskih kromatida u anafazi druge

mejotičke diobe (26). Moguće je i da pericentromerni položaj rekombinacije dovodi do prijevremenog odvajanja sestrinskih kromatida zbog degradacije centromernog proteinskog kompleksa kao i kohezijskog kompleksa koji povezuje sestrinske kromatide, te degradacije proteina diobenog vretena koja se pojačava sa starenjem majke (50,51). Povezanost greške u nerazdvajanju tijekom MII diobe i starosne dobi potvrđena je i u modelu kvasca u kojem protein *shugoshin*, koji je dio centromernog kohezijskog kompleksa, degradira ovisno o godinama što uzrokuje prijevremeno razdvajanje kromatida (52). Što se tiče većeg broja hijazmi duž kromosoma 21, Gosh i suradnici opazili su statistički značajno linearno povećanje proporcije višestrukih hijazmi, u slučajevima nerazdvajanja tijekom MI diobe u različitim dobnim grupama. Najmanji postotak višestrukih hijazmi uočen je u mlađoj grupi, a najveći u najstarijoj grupi majki. Ovaj podatak podupire hipotezu koja tumači da broj hijazmi može biti protektivan nasuprot učinku starosne dobi majke kao prvog rizičnog čimbenika nerazdvajanja kromosoma (53). Ovu hipotezu prvi je postavio Robinson sa suradnicima na temelju analize nerazdvajanja kromosoma 15 tijekom MI diobe. Oni su uočili da starije majke znatno češće imaju više rekombinacija duž kromosoma 15 nego mlađe majke (54).

Trisomija 21 nastala kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma tijekom spermatogeneze češće uključuje greške tijekom MII diobe i nije povezana s položajem rekombinacije (42).

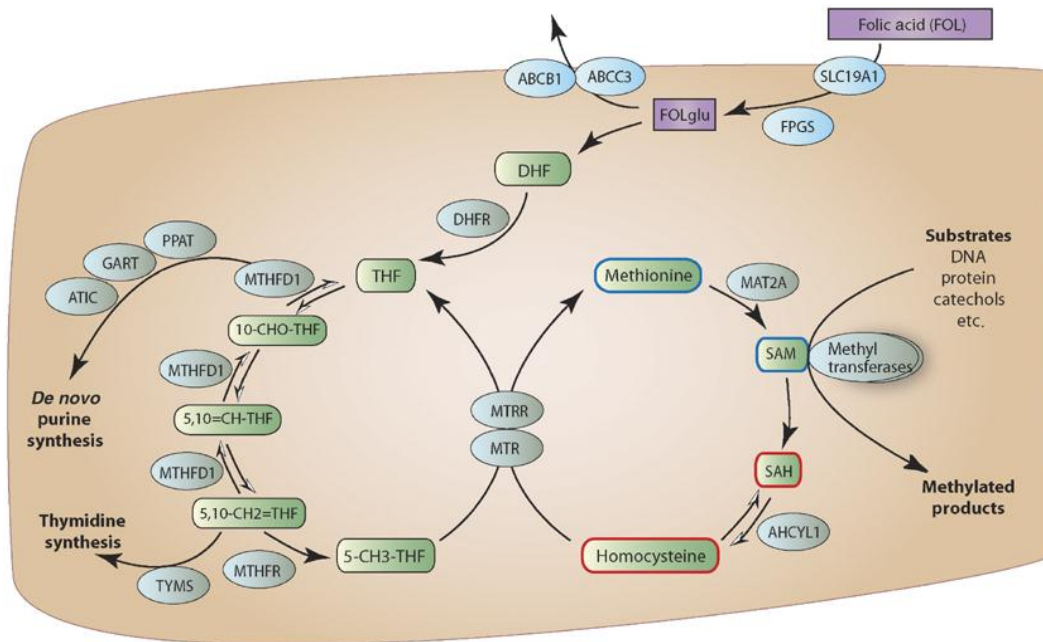
### **1.3. Metabolizam folata/homocisteina**

Folati su esencijalni vitamini potrebni u brojnim reakcijama metilacije koje utječu na normalnu staničnu diobu i rast. Povećane potrebe za folatima upravo se i javljaju pri rastu, u trudnoći i laktaciji (55,56). Deficit ovog vitamina dovodi do

poremećene proliferacije i morfoloških promjena svih stanica koje se dijele, zatim do anemije, gubitka težine, neuroloških i psihijatrijskih poremećaja te kongenitalnih abnormalnosti kao što je defekt neuralne cijevi (57-60). Adekvatan unos folata prije i tijekom trudnoće smanjuje rizik za pojavu navedenih poremećaja. Smatra se da su polimorfizmi nekih gena uključeni u metabolizam folata uzrok hipometilacije genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNA) što dovodi do poremećaja u pravilnoj diobi kromosoma, te da su rizični čimbenici za različite vrste tumora, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (60-65). Folate nalazimo u zelenom lisnatom povrću (špinat, salata, brokula), voću (naranče, limuni, jagode, kivi), grahu, žitaricama i jetri (55). Molekule folata su hidrofilne te se u stanicu mogu unijeti isključivo pomoću transportnih proteina (engl. Reduced folate carrier – RFC1). Nakon apsorpcije u ileumu folati se reduciraju i metiliraju u jetri u cirkulirajuću formu N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF), a zatim se otpuštaju u krvotok pa se u stanicama koriste za sintezu DNA i ribonukleinske kiseline, kao i za konverziju homocisteina (Hcy) u metionin. Folna kiselina je sintetski pripravak koji se dodaje u hranu i dodacima hrani te se također konvertira reakcijama redukcije i metilacije u biološku formu vitamina 5-metilTHF (66).

N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilentetrahidrofolat-reduktaza (engl. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase - MTHFR) je ključni enzim u redukciji N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>- metilentetrahidrofolata u 5-metilTHF koji je glavni supstrat za reakciju remetilacije Hcy u metionin, a koja je posredovana metionin sintazom (engl. Methionine synthase - MS). MS je enzim u ciklusu metionina ovisnom o vitaminu B12 (kobalamin) u kojem 5-metilTHF donira metilnu skupinu metioninu. Enzim N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza (engl. 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase - MTRR) odgovoran je za održavanje MS-a u

aktivnom obliku. Metionin je esencijalna aminokiselina potrebna za sintezu mnogobrojnih proteina, a jedan od njih je i S-adenozilmetionin (SAM), važan metilirajući agens koji sudjeluje u više od stotinu poznatih reakcija metilacije. SAM se konvertira u S-adenozilhomocistein (SAH) pomoću enzima metionin adenoziltransferaze pri čemu se metilna skupina predaje različitim biološkim akceptorima uključujući i DNA. SAH se zatim konvertira u Hcy i adenosin u reverzibilnoj reakciji koju katalizira SAH hidrolaza. Kada nema dovoljno metionina ili je koncentracija SAM mala, Hcy se usmjerava na put remetilacije koji katalizira MS. Alternativno, Hcy se može kondenzirati sa serinom u formu cistationina pomoću enzima cistationin  $\beta$ -sintetaze (CBS) uz kofaktor vitamin B6. Ovisno o potrebama stanice N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilentetrahydrofolat koristi se i u procesu sinteze pirimidina i purina *de novo* u reakcijama koje su katalizirane timidil sintazom i metilentetrahydrofolat dehidrogenazom (slika 1) (55,66,67).



Slika1. - Metabolizam folata/homocisteina

Ljubičasti pravokutnici prikazuju folnu kiselinu i poliglutamilnu folnu kiselinu (FOLglu), plavi ovali prikazuju gene, a zeleni zaobljeni pravokutnici prikazuju substrate i produkte metabolizma folata. ABCB1, P-glycoprotein; ABCC3, multidrug-resistant protein 3; ATIC, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase; AHCYL1, S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1; DHFR, dihydrofolate reductase; FPGS, folylpolyglutamyl synthase; GART, phosphoribosylglycinamide formyltransferase, cyclohydrolase, synthase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MTR, 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase; MTRR, 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase; PPAT, phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase; SLC19A1, solute-carrier family 19 (folate transporter), member 1; TYMS, thymidylate synthase; DHF, dihydrofolate; FOL-glu, polyglutamylated folic acid; SAM, S-adenosylmethionine; MAT2A, methionine adenosyltransferase II alpha; MTHFD1, trifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase, synthase; 5-CH<sub>3</sub>-THF, 5-methyl tetrahydrofolate; 5,10-CH<sub>2</sub>=THF, methylene tetrahydrofolate; 5,10=CH-THF, methenyl tetrahydrofolate; 10-CHO-THF, 10-formyl tetrahydrofolate. (preuzeto iz: [www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA2039&objCls=Pathway](http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA2039&objCls=Pathway))

### 1.3.1. Polimorfizmi gena metilentetrahidrofolat-reduktaze

5,10-Metilentetrahidrofolat-reduktaza (*MTHFR*) je gen (MIM: 607093; GeneID:4524) koji kodira istoimeni enzim važan u konverziji N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilentetrahidrofolata u 5-metilTHF. Humani *MTHFR* gen nalazi se na prvom kromosomu (1p36.3) i sastoji se od 11 egzona dužine 102 - 432 parova baza (pb) te od 10 introna dužine 0,25 - 1,5 kb. Do danas je poznato više od 20-ak mutacija na *MTHFR* genu kao što su supstitucije koje dovode do stvaranja jednog stop kodona (engl. nonsense mutations) (1762A-->T, 1134C-->G, 1084C-->T; 1711C-->T, 1274G-->A, W421X ), supstitucije jednog para baza koje dovode do kodiranja

različite aminokiseline (engl. missense mutations) (1727C-->T, 1172G-->A, 1768G-->A, 358G-->A, 249-1G-->T, 458T-->G, 980C-->T, 164C-->G, 1141T-->C, 983A-->G; 1027T-->G, 471C-->G, I153M; 1025T>C, M338T ) ili delecije (1553delAG) (68,69). Međutim, dva funkcionalno najvažnija polimorfizma *MTHFR* gena su C677T i A1298C.

#### 1.3.1.1. *MTHFR* C677T polimorfizam

*MTHFR* C677T polimorfizam nastaje supstitucijom baze citozina u timin u 4. egzonu što dovodi do zamjene aminokiseline alanina u valin (A222V). Polimorfizam je smješten u katalitičkoj domeni proteina i uzrok je njegove smanjene aktivnosti te utječe i na termolabilnost proteina (70,71). Aktivnost enzima u prisutnosti 677TT genotipa iznosi svega 30% od normalne aktivnosti koju ima enzim u prisutnosti 677CC genotipa. Aktivnost enzima kod heterozigota je 65% u odnosu na homozigote s genotipom 677CC (70,72). Međutim, zagrijavanjem na 46 °C/5 min aktivnost enzima dodatno se smanjuje te u prisutnosti 677TT genotipa iznosi svega 22%, za 677CT genotip iznosi 56%, a u slučajevima s 677CC genotipom iznosi 67% (70). Nadalje, uočeno je da u prisutnosti 677TT genotipa značajno raste koncentracija homocisteina u usporedbi s 677CT i 677CC genotipom. Enzim sa smanjenom aktivnošću slabije veže folate što znatno umanjuje prijenos metilnih skupina te može dovesti do različitih poremećaja (73). Znanstvene studije ukazuju da je polimorfizam *MTHFR* C677T rizični čimbenik za razvoj hiperhomocisteinemije, bolesti krvnih žila, ateroskleroze, karcinoma, shizofrenije i epilepsije (74-77). Smatra se da je *MTHFR* 677TT genotip rizični čimbenik za razvoj defekta neuralne cijevi. Kod majki koje su rodile dijete sa spinom bifidom češće je prisutan ovaj genotip te imaju smanjenu

koncentraciju folata i povećanu koncentraciju Hcy u plazmi (78-81). U svrhu prevencije oštećenja neuralne cijevi, u posljednja dva desetljeća velika je pažnja usmjerena k povećanom unosu folata u perikonceptijskom razdoblju žene kao i u prva tri mjeseca trudnoće (82,83). Povezanost *MTHFR* 677TT genotipa sa smanjenom DNA metilacijom uočena je u leukocitima periferne krvi, i to u osoba koje osim navedenog genotipa imaju i smanjenu koncentraciju folata. (84,85).

Distribucija *MTHFR* 677T alela varira s obzirom na regionalnu i etničku pripadnost. Genotip *MTHFR* 677TT učestaliji je u Meksiku (32%), južnoj Italiji (26%) i sjevernoj Kini (20%), dok je vrlo malo zastupljen u populaciji Afrikanaca (2%) (86,87). U Europi se prevalencija 677TT genotipa smanjuje od juga prema sjeveru. Najmanja prevalencija zabilježena je na sjeveru; 4 - 7% u Finskoj, sjevernoj Danskoj i Rusiji, a 8 - 10% u Francuskoj i Mađarskoj. Najviše vrijednosti TT genotipa su na jugu Europe; 12 - 15% u Španjolskoj i Italiji, a posebno se ističe pokrajina Kampanja i Sicilija gdje iznosi 20 - 26% (87).

#### **1.3.1.2. *MTHFR* A1298C polimorfizam**

Drugi funkcionalni polimorfizam *MTHFR* A1298C nastaje supstitucijom adenina u citozin što dovodi do zamjene aminokiseline glutamin u alanin (G429A) te je smješten u regulatornoj domeni proteina (69,88). Prisutnost ovog polimorfizma smanjuje aktivnost enzima, ali ne utječe na njegovu termolabilnost. Genotip 1298CC reducira aktivnost enzima više nego 1298AC genotip. Ovaj polimorfizam utječe na povećanu koncentraciju Hcy te sniženu koncentraciju folata u plazmi i stani. Ipak, njegov utjecaj na enzimatsku aktivnost enzima kao i koncentracije Hcy i folata manje je izražen nego utjecaj *MTHFR* C677T

polimorfizma (88). *MTHFR* A1298C polimorfizam smatra se rizičnim čimbenikom za različite karcinome, leukemije kao i za defekt neuralne cijevi (72,78,80,89).

Distribucija *MTHFR* 1298CC genotipa analizirana je na reprezentativnom uzorku od 1.064 ispitanika iz cijelog svijeta, koji su prema geografskoj i etničkoj pripadnosti spojeni u nekoliko grupa. Rezultati te analize ukazuju da je frekvencija 1298CC genotipa vrlo mala na području Meksika (1%) i Brazila (3%), zatim slijedi Kina (6%), Europa (8%) pa Afrika (9%). Najveća prevalencija uočena je u Pakistanu (34%) i Izraelu (25%) (86). Rezultati druge grupe autora pokazuju da je najveća učestalost 1298CC genotipa u Francuskoj (11,5%), zatim slijedi Sicilija (7,5%), Mexico City (2,3%) te područje zapadne Afrike (0,6 – 4,4%) (90).

#### **1.3.1.3. *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizmi kao rizični čimbenici za DS**

Na temelju dokaza da poremećaji u metabolizmu folata/homocisteina mogu rezultirati hipometilacijom DNA molekule i nepravilnim razdvajanjem kromosoma, James i suradnici prvi su postavili hipotezu da je polimorfizam *MTHFR* C677T rizični čimbenik za nerazdvajanje kromosoma tijekom oogeneze i DS-a (91). U svom istraživanju uočili su značajno povećanu koncentraciju Hcy u majki koje su rodile dijete s DS-om, što je pokazatelj poremećaja metabolizma folata. Isto tako uočili su da te majke imaju 2,6 puta veći rizik za DS u prisutnosti *MTHFR* 677T alela u odnosu na kontrolnu skupinu. U posljednjih desetak godina provedene su brojne asocijacijske studije s ciljem pojašnjavanja povezanosti *MTHFR* C677T polimorfizma i rizika za DS (63,92-93). Rezultati studija provedenih u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, Egiptu i Kini ukazuju da je polimorfizam *MTHFR* C677T neovisan rizični čimbenik podložnosti za DS (94-97). Studija provedena u Indiji ukazuje da je osim *MTHFR* 677TT genotipa i *MTHFR* 677CT genotip također



rizični čimbenik za DS (98). Sasvim suprotni rezultati dobiveni su u studijama provedenim u Turskoj i Japanu gdje nije dokazana povezanost C677T polimorfizma i DS (99,100). Razlike u rezultatima mogu biti odraz različite frekvencije alela u pojedinim populacijama ili različitosti u broju ispitanika te utjecaja okolišnih čimbenika kao što je prehrana. Tako na primjer, sve studije provedene u mediteranskim zemljama (Italija, Španjolska i Francuska) nisu pokazale da je *MTHFR* 677T alel neovisni rizični čimbenik za DS (101-109). To se objašnjava protektivnim utjecajem mediteranske prehrane, bogate folatima. U prilog ovoj pretpostavci ide istraživanje provedeno u Egiptu koje u grupi žena kod kojih je unos folata hranom bio ispod preporučene dnevne doze, kao rizični čimbenik za DS ističe *MTHFR* 677CT i 677TT genotipove (95).

*MTHFR* A1298C polimorfizam, kao mogući rizični čimbenik za DS nije istraživan tako opsežno kao C677T. Prva studija koja je uz *MTHFR* C677T polimorfizam uključila i A1298C provedena je na svega 36 majki koje su rodile dijete s DS-om (110). Autori iznose da je 1298C alel pojedinačno, ali i u kombinaciji s 677T alelom rizični čimbenik za DS. Slični rezultati dobiveni su u nekoliko narednih studija koje su pokazale da majke koje imaju *MTHFR* 677T alel ili *MTHFR* 677TT genotip u kombinaciji s *MTHFR* 1298C alelom imaju povećan rizik za DS (95,106,111-113).

Analizom oštećenja kromosoma u limfocitima periferne krvi mlađih majki s *MTHFR* 677TT i 1298AA genotipom uočena je veća frekvencija citoplazmatskog kromatina, koji je podrijetlom od acentričnih kromosomskih fragmenata ili cijelih kromosoma 21 i 13. Takvi rezultati upućuju da se kod majki s navedenim genotipom oštećenja ili nerazdvajanja kromosoma ne događaju samo u gametama, već i u somatskim stanicama (114, 115).

*MTHFR* C677T polimorfizam u kombinaciji s polimorfizmom drugog gena kao što je *RFC1*, *MTRR* ili *MS*, također može biti rizični čimbenik za DS (94,101,108,116,117). Isto tako, uočeno je da i kombinacije genotipova s više rizičnih polimorfizama mogu modulirati rizik za DS (111,118,119). Rizik za DS povećan je i kod žena starijih od 35 godina kada se radi o kombinaciji *MTHFR* 1298C i *RFC1* 80G alela (106). Studije provedene u žena mlađih od 35 godina na području centralne i južne Italije ukazuju da kombinacija genotipova *MTHFR* 1298AA i *RFC1* 80AA/ 80AG smanjuje rizik za DS (105,106,118). Rezultati dobiveni u studiji provedenoj na području centralne Italije navode da kombinacija genotipova *MTHFR* 1298AC i *TYMS* 2R/2R (engl. thymidylate synthase – *TYMS*) također smanjuje rizik za DS u odnosu na referentni genotip *MTHFR* 1298AA/*TYMS* 2R/2R (108).

Povezanost *MTHFR* C677T polimorfizma i ostalih trisomija slabije je istražena zbog njihove male incidencije. Samo je jedna studija ispitala vezu između *MTHFR* polimorfizama i ostalih poznatih trisomija humanih kromosoma. Statistički značajno povećana frekvencija *MTHFR* 677T alela uočena je jedino kod majki koje su pobacile plod ili rodile dijete sa sindromom Edwards (120).

### **1.3.2. Polimorfizam gena 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza**

5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza (*MTRR*) je gen (MIM: 602568; Gene ID: 4552) koji kodira istoimeni enzim i ima ulogu u redukciji kobalta u kobalamin što omogućuje održavanje *MS* enzima u aktivnom obliku, a time i nesmetano odvijanje reakcije remetilacije Hcy u metionin. Humani *MTRR* gen smješten je na petom kromosomu (5p15.2-15.3), veličine je oko 34 kb i sastoji se od 15 egzona različitih dužina, 43 - 1213 pb, te od 14 introna dužine 108

- 5 kb (121,122). Kod ljudi koji boluju od homocistinurije detektirano je 15-ak mutacija na *MTRR* genu (123-125). Najučestaliji polimorfizam *MTRR* gena u općoj populaciji nastaje supstitucijom adenina u gvanin u kodonu 66 (A66G) te dovodi do zamjene aminokiseline izoleucin u metionin (I22M), a smješten je u flavin mononukleotidnoj (FMN)-vezujućoj domeni *MTRR* proteina (122,126). Supstitucija navedenih aminokiselina smanjuje afinitet *MTRR* proteina za reduktivnu aktivaciju MS-a što utječe na smanjenu remetilaciju Hcy. Nije u potpunosti poznato kako ovaj polimorfizam utječe na aktivnost samog enzima, ali je studija Olteanua i suradnika pokazala da je za maksimalnu aktivaciju MS-a potrebno i do četiri puta više *MTRR* proteina kada je prisutan *MTRR* 66GG genotip (M22 varijanta proteina) u odnosu na ostale genotipove. Ukoliko je narušena funkcionalnost *MTRR* enzima, formirat će se manje metionina, a time i manje metilnih skupina što može dovesti do hipometilacije gena (126). Neke znanstvene studije pokazuju da je *MTRR* 66GG rizični čimbenik za defekt neuralne cijevi kao i za sindrom Down (127,128,129). Rezultati velike populacijske studije pokazali su da je frekvencija *MTRR* 66GG genotipa najveća u Pakistanu (51%), zatim slijede Europa (33%), Izrael (30%), Kina (19%), Afrika (8%), Meksiko (3%) i Brazil (1%). Frekvencija *MTRR* 66G alela najmanja je u Brazilu, svega 7%, a u Europi iznosi 52 - 57%. Najveća učestalost utvrđena je u Rusiji i iznosi 64% (86).

#### **1.3.2.1. *MTRR* A66G polimorfizam kao rizični čimbenik za DS**

Prva studija koja je istraživala povezanost *MTRR* polimorfizma i DS-a provedena je u Sjevernoj Americi. Rezultati te studije pokazali su da je *MTRR* 66GG genotip neovisni rizični čimbenik za DS (94). Studije provedene u sjevernoj Italiji i Kini također ukazuju da je *MTRR* 66GG kao i *MTRR* 66AG genotip neovisan

rizični čimbenik za DS (109,130). Neke studije pokazuju da je rizik za DS veći u prisutnosti kombinacije *MTRR* 66G i *MTHFR* 677T alela nego što je to u slučaju prisutstva pojedinačnih polimorfizama (116,117,129). Martinez-Frias je uočila da kombinacija genotipova *MTRR* 66GG i *MTHFR* 1298CC povećava razinu tHcy u majki koje su rodile dijete s DS-om (107). Da Silva i suradnici ukazuju da je rizik za DS rezultat kompleksnih interakcija između *MTRR* gena i drugih različitih polimorfizama u genima koji sudjeluju u metabolizmu folata/homocisteina kao što su *MTHFR*, *MS*, i *CBS* (111). U istraživanju provedenom na Siciliji utvrđen je povećan rizik za DS u prisutnosti kombinacije genotipova *MTR* 2756AG i *MTRR* 66GG (103). No, u nekim studijama nije pronađena veza između *MTRR* polimorfizma, pojedinačno ili u kombinaciji, i rizika za DS (104,106,108,118).

Iz svega navedenog vidljiv je veliki interes za ovu vrstu istraživanja, ali i velika raznolikost i kontradiktornost dobivenih rezultata. Pri izradi ovog doktorskog rada kritički su sagledani nedostaci dosadašnjih istraživanja pa je posebna pažnja bila usmjerena na pažljiv odabir kontrolne grupe i određivanje roditeljskog podrijetla trisomije 21 kao preduvjeta za utvrđivanje rizičnih čimbenika za trisomiju 21, što je posebno važno ako se oni poglavito odnose na majku.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi predstavljaju li polimorfizmi gena *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G, pojedinačno ili u kombinaciji, rizične čimbenike za nerazdvajanje kromosoma 21 u majki djece s DS i to s obzirom na starosnu dob, mejotičku diobu te broj i položaj rekombinacije.

*Pretpostavka ovog istraživanja bila je sljedeća:*

Prisutnost *MTHFR* C677T i A1298C te *MTRR* A66G polimorfizama modulira specifičnu aktivnost *MTHFR* i *MTRR* enzima koji sudjeluju u prijenosu metilnih skupina u reakciji remetilacije homocisteina u metionin. Smanjena aktivnost enzima rezultira manjom produkcijom metionina te dovodi do smanjene reakcije metilacije DNA, što može utjecati na nestabilnost i nerazdvajanje kromosoma 21. Istovremeno, nerazdvajanje kromosoma uvjetovano je i brojem i položajem rekombinacija, ali i starosnom dobi majke.

*Specifični ciljevi rada bili su sljedeći:*

- odrediti roditeljsko podrijetlo trisomije 21
- odrediti diobu (MI, MII, mitozu) u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21
- odrediti broj i položaj rekombinacija na 21q kromosomu
- analizirati učestalost alela, genotipova i haplotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama i *MTRR* A66G polimorfizma u roditelja djece s DS-om

U majki djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla:

- ispitati utjecaj pojedinog polimorfizma kao i njihovo zajedničko djelovanje na mejotičku diobu u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 s posebnim osvrtom na starosnu dob majke

- ispitati utjecaj pojedinog polimorfizma kao i njihovo zajedničko djelovanje na broj i položaj rekombinacija s posebnim osvrtom na starosnu dob majke.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 116 majki i 76 očeva djece s, postnatalno (N = 111) ili prenatalno (N = 5), citogenetički potvrđenom, trisomijom 21. Kompletnih tročlanih obitelji s DS-om (majka, otac i dijete) bilo je 76, a ostalih 40 obitelji bile su dvočlane (majka i dijete). U svim slučajevima radilo se o regularnom tipu trisomije 21. Kariotip majki i očeva djece s DS-om bio je uredan.

Ispitanici su prikupljeni u suradnji s udrugama za sindrom Down koje djeluju na području Republike Hrvatske (Rijeka, Split, Pula, Osijek, Zadar, Karlovac, Čakovec i Zagreb) i Klinike za ginekologiju i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Za odabir majki kontrolne grupe (N = 141) koristila se populacija trudnica koje su pristupile testu probira za DS i imale nizak rizik za DS te rodile zdravo dijete. Za odabir kontrolne grupe očeva (N = 101) koristila se DNA banka podataka dobrovoljnih davaoca krvi koja je pohranjena na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. U kontrolnu grupu uključene su samo one osobe koje su imale zdravu djecu i urednu obiteljsku i osobnu anamnezu. Ispitivane i kontrolne grupe bile su usklađene s obzirom na starosnu dob.

Molekularno-genetička analiza polimorfizama *MTHFR* i *MTRR* gena te analiza molekularnih markera u elektroforeznom sistemu SEA 2000 izvedena je na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Analiza molekularnih markera na genskom analizatoru ABI 3130 napravljena je u Laboratoriju za DNA Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku i Zavodu za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ženevi.

Analiza molekularnih markera na ALFexpress genskom sekvenatoru izvedena je u Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb.

Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Medicinski podaci i humani materijal prikupljen je u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Svi su ispitanici bili upoznati sa svrhom i metodologijom istraživanja te su dali pismeni pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.



## **3.2 Metode**

### **3.2.1. Izolacija genomske DNA i određivanje koncentracije i čistoće DNA**

Genomska DNA izolirana je iz periferne krvi (3 - 5 ml) dobivene venepunkcijom ili iz sline uzimanjem brisa bukalne sluznice ovisno o želji svakog ispitanika. Izolacija DNA izvedena je pomoću kitova za izolaciju, a prema protokolu koji navodi proizvođač (FlexiGene DNA Kit [uzorak: krv] i QIAamp DNA Micro Kit [uzorak: bukalna sluznica]; QIAGEN GmbH, Hilden, Njemačka). Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA određivana je spektrofotometrom prema uputama proizvođača (BioMate™3, Thermo electron corporation, SAD). Uzorci DNA bili su pohranjeni na -20 °C sve do analize.

### **3.2.2. Metoda lančane reakcije polimerazom i restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (PCR – RFLP metoda)**

Prisutnost *MTHFR* C677T i A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama utvrđivala se metodom lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase chain reaction – PCR), nakon koje je slijedila restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama (engl. Restriction fragment length polymorphism – RFLP). Umnožavanje ciljnog fragmenta genomske DNA molekule odvijalo se u volumenu od 25 µl u uređaju za PCR (engl. thermocycler) (Eppendorf). Uzorci su razdvojeni, u serijama od po 20 uzoraka uz negativnu i pozitivnu kontrolu, elektroforezom (30 min/80V) na 1% agaroznom gelu u koji se dodaje 0,1 mg/ml etidium bromida (5 µl PCR produkta i 1µl brom-fenol modrila (engl. Bromophenol blue – BPB). Veličina PCR produkta određivala se primjenom DNA standarda od 100 pb pomoću UV-svjetla transiluminatora. Restrikcijski fragmenti (8 µl restrikcijskog fragmenta + 2µl

BPB) odvojeni su elektroforezom (30 – 45 min pri 80V) na 3% agaroznom gelu u koji se dodaje 0,1 mg/ml etidium bromida, analizirani su pod UV-svjetlom transiluminatora, a veličina im se određuje primjenom DNA standarda od 25 i 100 pb.

### 3.2.2.1. Analiza *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama

Analiza *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama radila se prema protokolu kojeg su opisali Coppede i suradnici (105). Slijed početnih oligonukleotida za umnažanje ciljnog fragmenta genomske DNA u postupku genotipizacije *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama i sadržaj PCR reakcijske smjese prikazani su u tablicama 1 i 2.

Za umnažanje ciljnog fragmenta genomske DNA molekule u analizi polimorfizama *MTHFR* (C677T i A1298C) gena primijenjeni su sljedeći uvjeti PCR reakcije:

- *MTHFR* C677T: 94 °C/2 minute → 40 ciklusa (94 °C/30 sekundi, 62 °C/30 sekundi, 72 °C/30 sekundi) → 72 °C/7 minuta,
- *MTHFR* A1298C: 92 °C/2 minute (38 ciklusa (92 °C/1 minutu, 60 °C/1 minutu, 72°C /30 sekundi) → 72 °C/7 minuta.

Nakon PCR reakcije slijedila je restrikcija PCR produkata s Hinf I (u slučaju *MTHFR* C677T) i Mbo II (u slučaju *MTHFR* A1298C) restrikcijskim endonukleazama i njima pripadajućim puferima (Hinf I/0.1 + pufer 1X React2; MboII/0.1U + 1X pufer MboII). Restrikcijska smjesa (20 µl) inkubirana je u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C, 2 sata za *MTHFR* C677T, a za *MTHFR* A1298C preko noći. Očekivana veličina PCR produkta kao i restrikcijskih fragmenata za oba polimorfizma prikazana je u tablicama 3 i 4.

Tablica 1. Sekvence početnih oligonukleotida za *MTHFR* C677T i *MTHFR* A1298C

Oznaka početnice	Slijed početnice
<i>MTHFR</i> C677T - F	5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'
<i>MTHFR</i> C677T - R	5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'
<i>MTHFR</i> A1298C - F	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA3'
<i>MTHFR</i> A1298C - R	5'CACTTTGTGACCATTCCGTTTTG3'

F = forward, R = reverse

Tablica 2. PCR reakcijska smjesa ( $V = 25 \mu\text{l}$ )

Sadržaj reakcijske smjese	<i>MTHFR</i> C677T Konačna koncentracija	<i>MTHFR</i> A1298C Konačna koncentracija
10 x PCR pufer	1 X	1X
50 mM MgCl	2,5 mM	3mM
10 mM dNTP	0,2 mM	0,1mM
10 x početnica	20 pmol	10pmol
10 x početnica	20 pmol	10pmol
<i>Taq</i> polimeraza	1,25 U	1,25U
DNA	100 ng DNA	100 ng DNA
bidestilirana voda		

Tablica 3. Veličina PCR produkta i određivanje genotipova za *MTHFR* C677T polimorfizam na temelju veličine restrikcijskih fragmenata

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

Tablica 4. Veličina PCR produkta i određivanje genotipova za *MTHFR* A1298C polimorfizam na temelju veličine restrikcijskih fragmenata

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)
<i>MTHFR</i> 1298AA	163	56, 31/30, 28, 18
<i>MTHFR</i> 1298AC		84, 56, 31/30, 18
<i>MTHFR</i> 1298CC		84, 31/30, 18

### 3.2.2.2. Analiza *MTRR* A66G polimorfizma

Analiza *MTRR* A66G polimorfizma rađena je prema protokolu koji su opisali Jacques i suradnici (131). Slijed početnih oligonukleotida za umnažanje ciljnog fragmenta genomske DNA molekule u postupku genotipizacije *MTRR* A66G polimorfizma prikazan je u tablici 5.

Za umnažanje ciljnog fragmenta genomske DNA molekule primijenjena je sljedeća PCR reakcijska smjesa (25 µl) i uvjeti:

- 1X -10 x PCR pufer, 1,5mM - 50 mM MgCl, 200 µM - 10 mM dNTP, 50 ng početnica (10 x), 0,5U *Taq* polimeraza, 100 ng genomska DNA i bidestilirana voda
- 92 °C/2minute → 35 ciklusa (92 °C/60 sekundi, 56 °C/60 sekundi, 72 °C/90 sekundi) → 72 °C/7 minuta.

Za restrikciju PCR produkta korištena je *Alf* III (0.1U) restrikcijska endonukleaza te odgovarajući *Alf* III pufer (1X). Restrikcijska smjesa (20µl)

inkubirana je tri sata u vodenoj kupelji pri temperaturi 37 °C. Očekivana veličina PCR produkta i restrikcijskih fragmenata prikazana je u tablici 6.

Tablica 5. Sekvenca početnih oligonukleotida za *MTRR* A66G

Oznaka početnice	Slijed početnica
<i>MTRR</i> A66G - F	5'CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT3'
<i>MTRR</i> A66G - R	5'CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAACG3'

F = forward, R = reverse

Tablica 6. Veličina PCR produkta i određivanje genotipova za *MTRR* A66G polimorfizam na temelju veličine restrikcijskih fragmenata

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)
<i>MTRR</i> 66AA	150	150
<i>MTRR</i> 66AG		150, 123, 27
<i>MTRR</i> 66GG		123, 27

### 3.2.3. Analiza kratkih ponavljajućih sljedova

Za određivanje roditeljskog podrijetla trisomije 21 i diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja te analizu rekombinacija koristilo se 11 mikrosatelita ili kratkih ponavljajućih sljedova (engl. Short tandem repeats – STR): D21S258, D21S120, D21S1414, D21S11, D21S1432, D21S1435, D21S226, D21S270, INFAR, D21S1412 i D21S1411 (tablica 7, 8 i 9). Ciljni fragmenti genomske DNA umnoženi su primjenom metode PCR–STR i kvantitativno fluorescentnom lančanom

reakcijom polimerazom (engl. quantitative fluorescent polymerase chain reaction – QF-PCR). STR markeri umnoženi su, svaki za sebe ili zajedno (dva do sedam STR markera), koristeći neobilježene početnice ili početnice (*forward*) obilježene fluorescentnom bojom na 5' kraju. Početnice za navedene STR markere preuzete su iz baze *Ensembl Genome Browser* kao i iz objavljenih radova (132-134). PCR produkti odvojeni su ili gel elektroforezom ili kapilarnom elektroforezom.

### 3.2.3.1. PCR-STR i gel elektroforeza

Karakteristike i početnice STR markera prikazane su u tablici 7. STR markeri D21S120, D21S1432, D21S1412 i D21S1411 umnoženi su pojedinačno, a STR markeri D21S11 i D21S1435 zajedno, PCR-STR metodom u uređaju za PCR (Eppendorf). Reakcijsku smjesu opisali su Gomez i suradnici, a u ovom radu korištena je modificirana reakcijska smjesa koja ne sadrži 0.01% želatinu (135). Za umnažanje STR markera primijenjen je sljedeći protokol:

- PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 15  $\mu$ l: 1X - 10 x PCR pufer, 1,5mM - 50 mM MgCl, 200  $\mu$ M -10 mM dNTP, 10 pmol/ $\mu$ l svake početnice, 0,5 U *Taq* polimeraza, 50 - 100 ng/ $\mu$ l genomska DNA i bidestilirana voda
- PCR uvjeti: 95 °C/5minuta → 32 ciklusa (95 °C/30sekundi, 57<sup>a</sup> - 63<sup>b</sup> °C /1 minutu, 75 °C/1 minutu) → 72 °C/10 minuta); (<sup>a</sup> temperatura sljepljivanja početnica za STR markere D21S11 i D21S1435, <sup>b</sup> temperatura sljepljivanja početnica za STR markere D21S120, D21S1432, D21S1412 i D21S1411)

Elektroforeza PCR uzoraka (4  $\mu$ l PCR produkta i 1  $\mu$ l boje za nanošenje uzorka) odvijala se u elektroforeznom sistemu SEA 2000 s odgovarajućim puferom (1.2 M TAE pufer) pri naponu od 120 V, jakosti struje od 200 mA, temperaturi 55 °C, prema uputama proizvođača (Elchrom Scientific AG). Za

razdvajanje PCR produkata korišteni su različiti tipovi Spreadex gelova (Wide Mini S-2X13) (Elchrom Scientific AG). Uzorci su analizirani u serijama od po 12 uzoraka. STR markeri D21S11, D21S1432 i D21S1435 razdvojeni su elektroforezom u trajanju od 100 minuta na Spreadex gelu tipa EL 600. STR markeri D21S120 i D21S1412 razdvojeni su nakon 120 minuta koristeći gelove tipa EL 300 (za D21S120) i EL 1200 (za D21S1412), razdvajanje PCR produkta STR markera D21S1411 trajalo je 100 minuta na Spreadex gelu tipa EL 800.

Nakon elektroforeze, gel se boji 40 minuta u mraku uz neprestano miješanje u otopini za bojenje koja sadrži 5  $\mu$ l boje SYBER green, 20 ml 30 mM TAE pufera, 0,5 ml *Destaining solution* (Elchrom Scientific) i 30 ml destilirane vode. Zatim slijedi odbojavanje, 30 minuta uz neprestano miješanje, u otopini za odbojavanje koja sadrži 20 ml 30 mM TAE pufera, 0,5 ml *Destaining solution* (Elchrom scientific) i 30 ml destilirane vode. Vizualizacija PCR produkta vrši se UV-svjetlom transiluminatora, a veličina PCR produkta određivana je primjenom DNA standarda M3 (50 fragmenta veličine od 50 do 622 pb) (Elchrom Scientific). Rezultati elektroforeze analizirani su pomoću računalnog progama 1D<sup>TM</sup> Kodak Scientific System (*Kodak Scientific Imaging Systems*).

Tablica 7. Karakteristike STR markera razdvojenih gel elektroforezom u elektroforeznom sistemu SEA 2000 (ElchromScientific)

STR	Citogenetska pozicija	Fizikalna pozicija (Mb)	Veličina fragmenata pb#	Broj ponavljajućih nukleotida	Heterozigotnost	Slijed početnih oligonukleotida*
D21S120	21q11.2	14.7	318 - 330	di	0,70 <sup>G</sup>	F -GTGTGTCTGCCATTTCTGGGTGTAG R-GATCCTGGGACAAAGTAGTCTCTAA
D21S1432	21q11	16.3	127 - 155	tetra	0,52#	F - CTTAGAGGGACAGAACTAATAGGC R - AGCCTATTGTGGGTTTGTGA
D21S11	21q21.1	19.5i	202 - 236	tetra	0,90 <sup>B</sup>	F- ATATGTGAGTCAATCCCCAAG R - TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG
D21S1435	21q21.3	26.8	163 - 191	tetra	0,70#	F- CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC R - GCAAGAGATTCAGTGCCAT
D21S1412	21q22.2	39.7	384 - 414	tetra	0,80 <sup>G</sup>	F - CGGAGGTTGCAGTGAGTTG R - GGAAGGCTATGGAGGAGA
D21S1411	21q22.3	43.0	256 - 340	tetra	0,93 <sup>G</sup>	F - ATGATGAATGCATAGATGGATG R - AATGTGTGTCCTCCAGGC

\*početnice iz baze Ensembl Genome Browser, realase 49

# prema podacima iz baze CEPH Fondation Jean Dausset ili G – GENE DATA BASE: [www.gdb.org](http://www.gdb.org).

F = forward, R = reverse

### 3.2.3.2. PCR-STR i elektroforeza DNA u automatskom laser sekvenceru

STR markeri umnoženi su svaki za sebe PCR-STR metodom, a sve *forward* početnice na svom 5' kraju obilježene su fluorescentnom bojom Cy-5. Karakteristike i početnice STR markera prikazane su u tablici 8. Reakcijska smjesa sadržavala je 1 x PCR reakcijski pufer, 200 µM dNTP, 10 pmol svake početnice, 0,5 U *Taq* polimeraze te 30 - 50 ng genomske DNA i bidestiliranu vodu, ukupnog volumena 10 µl. Umnažanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u uređaju za PCR (Eppendorf) prema sljedećim PCR uvjetima:



- Za STR markere D21S1411 i D21S1414: 94 °C/30 sekundi → 27 ciklusa (94 °C/30 sekundi, 55 °C /1 minutu 15 sekundi, 72 °C/15 sekundi) → 72 °C/30 sekundi,
- Za STR marker D21S1435: 95 °C/30 sekundi → 35 ciklusa (95 °C/30 sekundi, 53 °C /1 minutu 15 sekundi, 72 °C/30 sekundi) → 72 °C/30 sekundi.

Nakon PCR-a u epruvetu za elektroforezu doda se po 1,5 µl PCR produkta, 3 µl boje za nanošenje uzoraka i 1µl unutarnjeg DNA standarda 1 i 2 poznate duljine fragmenata. Standard 1 je bio duljine manje od duljine najmanjeg poznatog alela testiranog STR markera, a standard 2 je bio dulji od najduljeg poznatog alela testiranog STR-a. U posebnu epruvetu doda se 8 µl vanjskog DNA standarda *ALFexpress Sizer 50 – 500* (10 fragmenata od 50 do 500 pb), 8 µl TE pufera i 24 µl boje za nanošenje uzoraka. Epruvete se poklope odgovarajućim poklopcima, uzorci i standard denaturiraju se na 95 °C, te 3 minute nakon toga stave se na led do trenutka nanošenja na gel. Elektroforeza se provodi na 6-postotnom poliakrilamidnom gelu, debljine 0,5 mm, uronjenom u 0.6XTBE pufer u automatskom laser DNA sekvenceru prema uputama proizvođača (ALFexpress, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) pod sljedećim uvjetima: 1200V, 40mA, 50W i 50 °C. Određivanje duljine fragmenata DNA provedeno je uz pomoć računalnog programa *Allele Locator* (Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska). Dialelni lokus definiran je u prisutnosti dva pika u omjeru 1 : 1 ili jednim pikom u slučaju homozigotnog alela. Trisomičan alel može biti prikazan s tri pika u omjeru 1 : 1 : 1, dva pika u omjeru 2 : 1 ili jednim pikom u slučaju homozigotnog alela (133).

Tablica 8. Karakteristike STR markera razdvojenih u ALFexpress DNA sekvenceru

STR	Fluorescentna boja	Citogenetska pozicija	Fizikalna pozicija	Veličina fragmenata pb	Broj ponavljajućih nukleotida	Heterozigotnost	Sekvenca početnih oligonukleotida*
D21S1414	Cy5	21q21	19.5	325 - 371	tetra	0,93	F- AAATTAGTGTCTGGCACCCAGTA R- CAATTCCCCAAGTGAATTGCCTTC
D21S1435	Cy5	21q21.3	26.8	163 - 187	tetra	0,77	F- CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC R- GCAAGAGATTTTCAGTGCCAT
D21S1411	Cy5	21q22.3	43.0	208 - 272	tetra	0,89	F-ATGATGAATGCATAGATGGATG R- CCCAGCCCTCTAAATATCATCC

\*Crkvenac-Gornik (2007), F = forward, R = reverse

### 3.2.3.3. QF-PCR i kapilarna elektroforeza

STR markeri umnoženi su metodom QF-PCR prema modificiranom protokolu Manna i suradnika (133,136). U jednoj reakcijskoj smjesi umnoženo je šest STR markera (D21S11, D21S1435, D21S226, D21S270, INFAR i D21S1411), a u drugoj sedam STR markera (D21S258, D21S120, D21S11, D21S1435, D21S226, D21S1270 i D21S1411). Sve *forward* početnice na svom 5' kraju obilježene su fluorescentnom bojom NED ili 6-FAM. Karakteristike i početnice STR markera prikazane su u Tablici 9.

Za umnažanje ciljnih fragmenata korišten je Qiagen Multiplex PCR kit 100 (Qiagen GmbH, Germany) koji sadrži optimizirane koncentracije HotStarTaq DNA polimeraze, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-e i PCR pufer te uravnoteženu koncentraciju soli i dodataka.

QF-PCR reakcijska smjesa, ukupnog volumena 15  $\mu$ l, sastoji se od 7,5  $\mu$ l Qiagen Multiplex PCR kit 100, 1,5  $\mu$ l početnica (5 pmol svake početnice) te 6  $\mu$ l genomske DNA (20 – 50ng). Za umnažanje genomske DNA koristio se sljedeći protokol:

- 95 °C/15 minuta → 28 ciklusa (94 °C/30 sekundi, 57 °C /1 minuta 30 sekundi, 72 °C/1 minuta 30 sekundi) → 72 °C/20 minuta.

PCR produkti razdvajaju se kapilarnom elektroforezom na uređaju *ABI 3130 Genetic Analyzer* prema uputama proizvođača (Applied Biosystems). *ABI 3130* je četverokapilarni sustav koji preferira jednolančanu DNA radi bolje pokretljivosti u polimeru kojim su ispunjene kapilare. Stoga se umnoženi fluorescentno označeni odsječci DNA prije elektroforeze denaturiraju dodatkom formamida tako što se u epruveti za elektroforezu (*Genetic analyzer 0,5ml sample Tubes*) pomiješa po 1,5  $\mu$ l QF-PCR produkta, 9  $\mu$ l formamida i 0,5  $\mu$ l unutrašnjeg standarda 500ROX (16 fragmenata veličine od 35 do 500 pb, *GeneScan – 500ROX Standard<sup>TM</sup>*, Applied Biosystems). Epruvete se poklope odgovarajućim poklopcima i uzorci se denaturiraju na 95 °C, 3 minute, a nakon toga stave se na led do nanošenja na mikrotitarske pločice. Nakon elektroforeze dobiveni podaci analiziraju se računalnim programom *GeneMapper (Software v3.7, AppliedBiosystems)*. Dialelni lokus definiran je s dva pika jednake visine i površine što odgovara urednom nalazu. Ako su oba alela iste dužine (homozigot), pikovi se superponiraju te nije moguć proračun njihovog odnosa i rezultat se smatra neinformativnim. Tri pika jednakog opsega u omjeru 1 : 1 : 1 kao i dva pika s omjerom opsega 2 : 1 ukazuju na prisustvo triju alela. Uzorak je definiran kao trisomičan ukoliko najmanje dva STR markera pokazuju tri alela. Euploidan, normalan, je onaj uzorak kod kojeg su utvrđena najmanje dva dialelana markera.

Tablica 9. Karakteristike STR markera razdvojenih kapilarnom elektroforezom

STR	Fluorescentna boja	Citogenetska pozicija	Fizikalna pozicija (Mb)	Veličina fragmenata pb	Broj ponavljajućih nukleotida	Heterozigotnost	Sekvenca početnih oligonukleotida
D21S258*	NED	21q11.1	14.3	190 - 194	di		F- CTCAAATACGACTCCAGAGG R-GGACAGTGTTCACTATTTCAG
D21S120*	6-FAM	21q11.2	14.7	318 - 330	di	0,70 <sup>GD</sup>	F – GTGTGTCTGCCATTTCTGGGTGTAG R – GATCCTGGGACAAAGTAGTCTCTAA
D21S11	6-FAM	21q21	19.5	225 - 280 <sup>M</sup>	tetra	0,855	F-TTTCTCAGTCTCCATAAATATGTG GATGTTGTATTAGTCAATGTTCTC
D21S1435	6-FAM	21q21.3	26.8	160 - 200 <sup>M</sup>	tetra	0,70#	F-CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC R-ACAAAAGGAAAGCAAGAGATTCA
D21S226	6-FAM	21q22.1	31.3	440 - 470 <sup>M</sup>	tetra		F-GCAAATTTGTGGATGGGATTAACAG R -AAGCTAAATGTCTGTAGTTATTCT
D21S270	6-FAM	21q21-q22.1	31.7	285 - 340 <sup>M</sup>	tetra	0,964	F-CTATCCCACTGTATTATTCAGGGC R-TGAGTCTCCAGGTTGCAGGTGACA
INFAR	NED	21q22.1	34.7	370 - 410 <sup>M</sup>	tetra	0,83	F- CATTGATCTTAGCCATCTATTGC R-ACTATGCAGCCATTTGAAAGACTA
D21S1411	NED	21q22.3	43.0	256 - 340 <sup>M</sup>	tetra	0,836#	F-ATAGGTAGATACATAAATATGATGA R-TATTAATGTGTGTCCTCCAGGC

\*početnice iz baze Ensembl Genome Browser , realase 49, <sup>M</sup> – veličina fragmenata i početnice opisane u radu K. Mann et al. Eur J Hum Genet 2004

# prema podacima iz baze CEPH Fondation Jean Dausset ili G – GENE DATA BASE: [www.gdb.org](http://www.gdb.org).

F = forward, R = reverse,

### 3.2.4. Određivanje podrijetla trisomije 21

Utvrđivanje roditeljskog podrijetla trisomije 21 i diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma izvodilo se prema protokolu kojeg su opisali Freeman i suradnici (137). Koristili smo 11 STR markera raspoređenih duž dugog kraka kromosoma 21 kako slijedi; centromera - D21S258, D21S120, D21S1414,

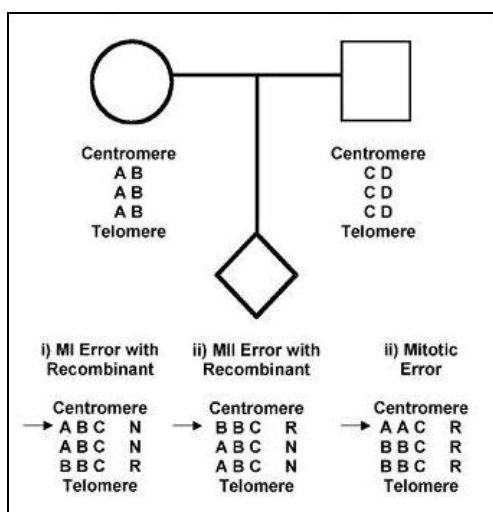
D21S11, D21S1432, D21S1435, D21S226, D21S270, INFAR, D21S1412 i D21S1411 - telomera.

Za analizu roditeljskog podrijetla kromosoma 21 korišteno je šest STR markera (D21S120, D21S11, D21S1432, D21S1435, D21S1412 i D21S1411). U slučajevima gdje navedeni markeri nisu bili dovoljno informativni, broj STR markera se povećavao. Kod obitelji s tri člana (mama, tata i dijete) određivanje roditeljskog podrijetla kromosoma 21 temeljilo se na informativnim rezultatima dobivenim za najmanje dva STR markera (slika 2). Najmanje pet informativnih STR markera koristili smo u slučajevima dvočlanih obitelji (mama i dijete) (slika 3).

Za određivanje mejotičke diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21 koriste se isključivo pericentromerni STR markeri. U tu svrhu korišteni su sljedeći markeri: D21S258, D21S120, D21S1414 i D21S1432. Određivanje mejotičke diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma temelji se na uspoređivanju genotipa (homozigot/heterozigot) pericentromernih STR markera između roditelja kod kojeg je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21 i djeteta s trisomijom 21. Ako je heterozigotni oblik STR markera prisutan i u roditelja i u djeteta, onda se radi o nerazdvajanju tijekom prve mejotičke diobe. Homozigotni oblik STR markera u djeteta ukazuje na nerazdvajanje kromosoma u drugoj mejotičkoj diobi ili u mitozu. U tom se slučaju gledaju ostali STR markeri duž kromosoma 21. Ukoliko su ostali markeri prisutni u heterozigotnom obliku kao i kod roditelja, onda se radi o nerazdvajanju u drugoj mejotičkoj diobi, a ako su svi ostali markeri u djeteta u homozigotnom obliku radi se o postzigotnom, odnosno mitotskom nerazdvajanju (slika 2).

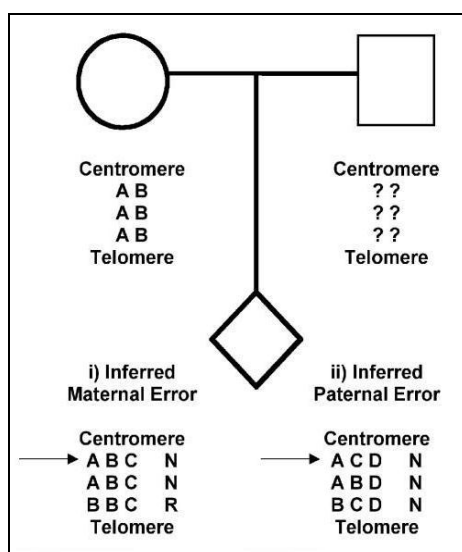
### 3.2.5. Analiza rekombinacija

Za potrebe analize broja i položaja rekombinacija, dugi krak kromosoma 21q podijelili smo u tri intervala: proksimalni - D21S258-D21S120-D21S1414-D21S1432-D21S11, medijalni - D21S11-D21S1435-D21S226-D21S270-INFAR i distalni interval INFAR-D21S1412-D21S1411. Prisutnost rekombinacije utvrđuje se usporedbom informativnih STR markera roditelja kod kojeg je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21 i djeteta s trisomijom 21, i to u smjeru od centromere prema telomeri. Promjena heterozigotnog oblika STR markera u homozigotni oblik ili obrnuto, između susjednih informativnih markera, ukazuje na prisutnost rekombinacije. Položaj rekombinacije određuje se prema prisutnosti rekombinacije u određenom zadanom intervalu (slika 2).



Slika 2. Algoritam određivanja roditeljskog podrijetla kromosoma 21, diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma i rekombinacije.

STR markeri označeni su slovima A, B, C i D. Prikazana su tri hipotetska genotipa. STR marker smješten najbliže centromeri označen je strelicom. Slovom «R» prikazana je promjena heterozigotnog oblika STR markera roditelja u homozigotni oblik kod djeteta, a slovom «N» prikazan je heterozigotni oblik markera prisutan kod djeteta i roditelja (preuzeto iz Freeman S.B. i sur. Public Health Reports 2007, 22: 62-72).



Slika 3. Algoritam određivanja podrijetla kromosoma 21, diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma i rekombinacije kod dvočlanih obitelji (mama i dijete)

STR markeri označeni su slovima A, B, C i D. Prikazana su tri hipotetska genotipa. STR marker smješten najbliže centromeri označen je strelicom. Slovom «R» prikazana je promjena heterozigotnog oblika STR markera roditelja u homozigotni oblik kod djeteta, a slovom «N» prikazan je heterozigotni oblik markera prisutan kod djeteta i roditelja (preuzeto iz Freeman S.B. i sur. Public Health Reports 2007, 22: 62-72).

### 3.2.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvedena je pomoću računalnih programa Statistika 8.0 (StatSoft, Inc. 2008. STATISTICA, data analysis software system, version 8.0) i MedCalc (Copyrights 11.3.0.0. 2003-2010).

Za usporedbu učestalosti alela i genotipova u grupi ispitanika i kontrole koristio se  $X^2$  test i Fisherov egzaktni test. Procjena rizika genotipova i njihovih kombinacija za trisomiju 21 temeljila se na omjeru izgleda (engl. odds ratios - OR) i pripadajućeg 95-postotnog raspona pouzdanosti (engl. confidence interval - CI).

Za izračunavanje očekivane frekvencije homozigota i heterozigota za ispitivane polimorfizme koristila se Hardy-Weinbergova jednadžba:  $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ ; gdje p predstavlja frekvenciju alela divljeg tipa, a q frekvenciju mutiranog alela. Odstupanja od

utvrđenih distribucija genotipova od onih predviđenih Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom ispitala su se  $X^2$  testom.

Učestalost haplotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama izračunata je prema metodi opisanoj u studiji Ogino i suradnika (138).

Dobne skupine određene su primjenom ROC (engl. Receiver Operating Characteristic) metode.

U analizi učestalosti alela i genotipova s obzirom na starosnu dob (dobnu skupinu) ispitanica i kontrolnih majki te mejotičku diobu i broj rekombinacija kombinirao se genotip *MTHFR* 677CT i 677TT te *MTHFR* 1298AC i 1298CC zato što oba smanjuju aktivnost enzima (70). Kod *MTRR* A66G polimorfizma kombinirao se genotip 66AA i 66AG jer se smatra da u kombinaciji tih genotipa protein ne gubi afinitet za reduktivnu aktivaciju MS-a (124,128).

Povezanost pojedinačnih polimorfizama s nerazdvajanjem kromosoma u prvoj ili drugoj mejotičkoj diobi te položajem i brojem rekombinacija testirala se Spearmanovim rank korelacijskim testom.

Statističke značajnosti određivane su na razini  $p < 0,05$ .



#### 4. REZULTATI

U tablici 10 prikazani su demografski podatci majki i očeva djece s DS-om i kontrolnih grupa. Srednja dob majki i očeva djece s DS-om nije se statistički značajno razlikovala od starosne dobi kontrolnih grupa ( $P > 0,05$ ).

Tablica 10. Demografski podaci ispitivane populacije

	Žene			Muškarci		
	Ispitanice (N = 116)	Kontrola (N = 141)	P	Ispitanici (N = 76)	Kontrola (N = 101)	P
Starosna dob Srednja vrijednost $\pm$ SD	31,06 $\pm$ 6,47	31,42 $\pm$ 4,91	0,608	33,75 $\pm$ 6,93	35,33 $\pm$ 7,54	0,153
Stručna sprema, N (%)						
NSS	8 (7)	7 (5)	0,696	4 (5)	12 (12)	0,209
SSS	80 (69)	79 (56)	0,046	55 (73)	65 (64)	0,333
VSS	19 (16)	18 (13)	0,520	12 (16)	17 (17)	0,984
VŠS	9 (8)	37 (26)	0,0002	5 (6)	7 (7)	0,833

NSS – niska stručna sprema, SSS – srednja stručna sprema, VSS – viša stručna sprema, VŠS – visoka stručna sprema

U grupi ispitivanih majki djece s DS-om nije zabilježen ni jedan slučaj perikonceptijske primjene folne kiseline koja podrazumijeva razdoblje od 4 tjedna prije trudnoće pa do 8. tjedna gestacije. Pripravke folne kiseline kao što je Prenatal konzumiralo je 13% majki ispitivane grupe i to u razdoblju od 6. do 8. tjedna trudnoće, obično nakon prvog dolaska ginekologu, pa nadalje. U kontrolnoj grupi majki zdrave djece perikonceptijska primjena folne kiseline utvrđena je u 11%, a postkonceptijska u 54% slučajeva.

Promjene u prehrani tijekom trudnoće navelo je svega 5% ispitanica i 9% majki kontrolne grupe. Promjene u prehrani uglavnom su se odnosile na nekonzumiranje određene vrste hrane zbog mučnina u prvim tjednima trudnoće. Učestalosti konzumiranja namirnica bogatih folatima prikazane su u tablici 11. Statistički značajne razlike nisu utvrđene ( $P > 0,05$ )

Tablica 11. Učestalost konzumiranja namirnica bogatih folatima

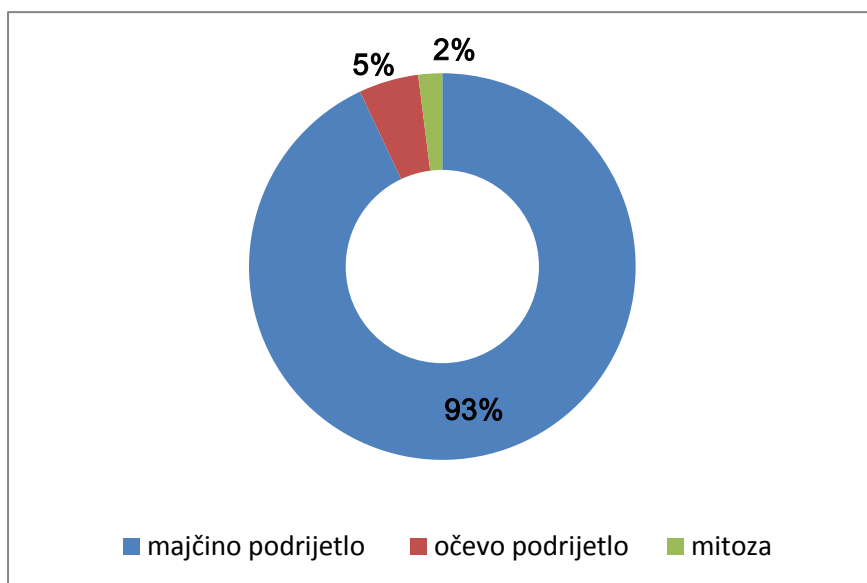
NAMIRNICA	NIKADA		JEDNOM MJESEČNO		2-3 PUTA MJESEČNO		JEDNOM TJEDNO		2-3 PUTA TJEDNO		SVAKI DAN	
	Ispitanice N (%)	Kontrola N(%)	Ispitanice N (%)	Kontrola N(%)	Ispitanice N (%)	Kontrola N(%)	Ispitanice N (%)	Kontrola N(%)	Ispitanice N (%)	Kontrola N(%)	Ispitanice N (%)	Kontrola N(%)
SALATE	6 (5)	6 (4)	7 (6)	7 (5)	4 (3)	6 (4)	12 (10)	10 (7)	59 (51)	74 (53)	29 (25)	38 (27)
ZELENO LISNATO POVRĆE	6 (5)	6 (4)	5 (4)	3 (2)	6 (5)	6 (4)	29 (25)	28 (20)	63 (55)	85 (61)	7 (6)	13 (9)
MAHUNARKI	4 (3)	3 (2)	5 (4)	7 (5)	31 (27)	34 (24)	67 (58)	79 (56)	9 (8)	18 (13)		
TELEĆA JETRA	64 (55)	79 (56)	28 (24)	35 (25)	6 (5)	6 (4)	18 (16)	21 (15)				
VOĆE									14 (12)	13 (9)	102 (88)	128 (91)
CORN FLAKES, MÜESLE	23 (20)	25 (18)	12 (10)	13 (9)	6 (5)	6 (4)	17 (15)	20 (14)	35 (30)	46 (33)	23 (20)	31 (22)

#### 4.1. Podrijetlo trisomije 21

Određivanje roditeljskog podrijetla trisomije 21 i diobe u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma provedeno je na 116 obitelji. Tročlanih obitelji bilo je 76 (mama, tata i dijete s DS-om), a dvočlanih 40 (mama i dijete s DS-om). Od ukupno 116 obitelji u 102 (88%) obitelji dobiveni su informativni rezultati. Podrijetlo trisomije 21 uspješno je određeno u 99% (75/76) tročlanih obitelji te u 68% (27/40) dvočlanih obitelji. Neinformativni slučajevi (N = 14; 12%) izuzeti su iz daljnjih analiza.

Slika 4 prikazuje podrijetlo trisomije 21. Majčino podrijetlo trisomije utvrđeno je u 93% slučajeva i najčešće se radilo o nerazdvajanju kromosoma u MI diobi (86%) (tablica 10). Očevo podrijetlo trisomije 21 utvrđeno je u 5% trisomija, a u 2% slučajeva radilo se o mitotskom, postzigotnom nerazdvajanju kromosoma (slika 4).

U slučajevima trisomije 21 majčinog podrijetla utvrđeno je da je srednja dob majki ( $31,44 \pm 6,52$ ) statistički značajno veća od starosne dobi majki djece s trisomijom 21 očevog ili postzigotnog podrijetla ( $23,71 \pm 1,79$ ) ( $P = 0,010$ ) (tablica 10). Statistički značajna razlika utvrđena je i u starosnoj dobi očeva djece s DS-om majčinog podrijetla ( $34,32 \pm 6,9$ ) u odnosu na starosnu dob očeva djece s DS-om očevog ili mitotskog podrijetla ( $26,66 \pm 2,51$ ) ( $P = 0,046$ ) (tablica 10). U slučajevima trisomije 21 majčinog podrijetla nije utvrđena statistički značajna razlika u starosnoj dobi majki između MI i MII diobe ( $P = 0,153$ ) (tablica 12).



Slika 4. Podrijetlo trisomije 21

Tablica 12. Podrijetlo trisomije 21 i starosna dob roditelja

Podrijetlo trisomije 21	Učestalost N (%)	Starosna dob majki Srednja vrijednost $\pm$ SD	Starosna dob očeva Srednja vrijednost $\pm$ SD
Majčino podrijetlo	95 (93%)	31,44 $\pm$ 6,52	34,32 $\pm$ 6,90
Mejoza I	82 (86%)	31,06 $\pm$ 6,69	34,16 $\pm$ 7,26
Mejoza II	13 (14%)	33,84 $\pm$ 4,93	35,44 $\pm$ 3,57
Očevo podrijetlo	5 (5%)	23,80 $\pm$ 1,92	26,66 $\pm$ 2,51
Mejoza I	4 (80%)	23,00 $\pm$ 0,81	25,50 $\pm$ 2,12
Mejoza II	1 (20%)	27,00	29,00
Mitotsko	2 (2%)	23,50 $\pm$ 2,12	26,00
Ukupan broj slučajeva	102		

#### 4.2. *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizmi i trisomija 21

Analiza *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama izvedena je na uzorku od 95 majki djece s trisomijom 21 nastalom kao posljedicom nerazdvajanja kromosoma tijekom oogeneze (majčino podrijetlo trisomije 21). Majke zdrave djece, iste prosječne dobi kao i ispitivana grupa, činile su kontrolnu grupu (N = 141). Analizirane distribucije genotipova podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi za:

- *MTHFR* 677T polimorfizam u skupini majki djece s DS-om  $p = 0,998$ , a u kontrolnoj skupini  $p = 0,850$ ;
- *MTHFR* A1298C polimorfizam u skupini majki djece s DS-om  $p = 0,506$ , a u kontrolnoj skupini  $p = 0,526$ ;
- *MTRR* A66G u skupini majki djece s DS-om  $p = 0,947$ , a u kontrolnoj skupini  $p = 0,300$ .

Učestalost genotipova i alela za *MTHFR* C677T polimorfizam prikazana je u tablici 13, za *MTHFR* A1298C u tablici 14, a za *MTRR* A66G polimorfizam u tablici 15. Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji pojedinih genotipova i alela između ispitanica i kontrolne skupine za navedene polimorfizme ( $P > 0,05$ ).

Tablica 13. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141)

<i>MTHFR</i> C677T	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
CC	45 (47)	66 (47)	Referentni genotip	
CT	38 (40)	64 (45)	0,80 (0,50 - 1,51)	0,623
TT	12 (13)	11 (8)	1,60 (0,64 - 3,94)	0,306
Alel				
C	128 (67)	196 (70)	Referentni alel	
T	62 (33)	86 (30)	1,10 (0,74 - 1,63)	0,624

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 14. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141)

<i>MTHFR</i> A1298C	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
AA	45 (47)	63 (45)	Referentni genotip	
AC	43 (46)	68 (48)	0,88 (0,51 - 1,52)	0,889
CC	7 (7)	10 (7)	0,98 (0,34 - 2,76)	0,969
Alel				
A	133 (70)	194 (69)	Referentni alel	
C	57 (30)	88 (31)	0,98 (0,63 - 1,40)	0,780

OR – engl. odds ratio – omjer izgleda, CI – engl. confidence interval – raspon pouzdanosti

Tablica 15. Učestalost genotipova i alela *MTRR* A66G polimorfizma u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141)

<i>MTRR</i> A66G	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
AA	18 (19)	26 (18)	Referentni genotip	
AG	51 (54)	82 (58)	0,89 (0,44 - 1,80)	0,762
GG	26 (27)	33 (24)	1,13 (0,51 - 2,50)	0,748
Alel				
A	87 (46)	134 (48)	Referentni alel	
G	103 (54)	148 (52)	1,07 (0,74 - 1,55)	0,712

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama prikazana je u tablici 16. Nije utvrđena statistička značajna razlika u frekvenciji kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama između ispitivane i kontrolne grupe ( $P > 0,05$ ).

Frekvencija haplotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama prikazana je u tablici 17. Nije utvrđena statistička značajna razlika u frekvenciji haplotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama između ispitivane i kontrolne grupe ( $P > 0,05$ ).

Tablica 16. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141)

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip					
CC	AA	13 (14)	17 (12)	Referentni genotip	
CC	AC	25 (26)	39 (27)	0,83 (0,34 - 2,02)	0,694
CC	CC	7 (7)	10 (7)	0,91 (0,27 - 3,05)	0,885
CT	AA	20 (21)	35 (25)	0,74 (0,30 - 1,85)	0,529
CT	AC	18 (19)	29 (20)	0,81 (0,31 - 2,05)	0,660
CT	CC	0	0		
TT	AA	12 (13)	11 (8)	1,42 (0,47 - 4,24)	0,523
TT	AC	0	0		
TT	CC	0	0		

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 17. Učestalost haplotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141)

Haplotip <i>MTHFR</i> C677T/A1298C	Ispitanice	Kontrola	P
C-A	0,373	0,383	0,838
C-C	0,300	0,313	0,780
T-A	0,327	0,304	0,623
T-C	0	0	



Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizama prikazana je u tablici 18. Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizama u ispitivanih skupina ( $P > 0,05$ ).

Tablica 18. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141)

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTRR</i> A66G	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
CC	AA	9 (10)	15 (11)	Referentni genotip	
CC	AG	25 (26)	40 (28)	1,04 (0,39 - 2,73)	0,934
CC	GG	11 (12)	11 (8)	1,66 (0,51 - 5,39)	0,394
CT	AA	7 (7)	11 (8)	1,06 (0,30 - 3,72)	0,926
CT	AG	20 (21)	36 (25)	0,92 (0,34 - 2,49)	0,879
CT	GG	11 (12)	17 (12)	1,07 (0,35 - 3,31)	0,895
TT	AA	2 (2)	0 (0)	8,15 (0,35 - 188,8)	0,190
TT	AG	6 (6)	6 (4)	1,66 (0,41 - 6,76)	0,474
TT	GG	4 (4)	5 (4)	1,33 (0,28 - 6,3)	0,761

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

U tablici 19. prikazana je učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama. Statistički značajna razlika u frekvenciji kombinacija genotipova između ispitanica i kontrolne grupe nije utvrđena ( $P > 0,05$ ).

Učestalost kombinacija genotipova svih triju polimorfizama zajedno prikazana je u tablici 20. Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji kombinacije genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama između ispitivanih skupina ( $P > 0,05$ ).

Tablica 19. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om ( $N = 95$ ) i majki zdrave djece ( $N = 141$ )

<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
AA	AA	7 (7)	12 (9)	Referentni genotip	
AA	AG	26 (27)	36 (26)	1,23 (0,42 - 3,57)	0,692
AA	GG	12 (13)	15 (10)	1,37 (0,41 - 4,56)	0,606
AC	AA	11 (12)	12 (9)	1,57 (0,45 - 5,43)	0,475
AC	AG	20 (21)	41 (29)	0,83 (0,28 - 2,44)	0,744
AC	GG	12 (13)	15 (10)	1,37 (0,41 - 4,56)	0,606
CC	AA	0	2 (1)	0,33 (0,01 - 7,92)	0,496
CC	AG	5 (5)	5 (4)	1,71 (0,36 - 8,08)	0,495
CC	GG	2 (2)	3 (2)	1,14 (0,15 - 8,59)	0,896

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanost

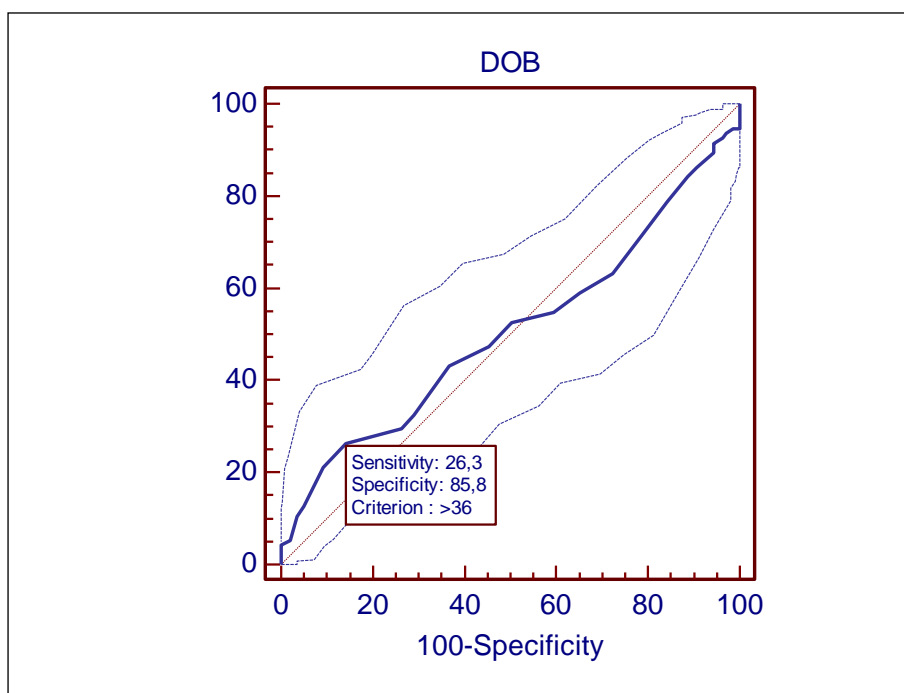
Tablica 20. Učestalost kombinacija genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i kontrolne skupine majki (N = 141)

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Ispitanice N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip						
CC	AA	AA	1 (1)	6 (4)	Referentni genotip	
CC	AA	AG	9 (9)	10 (7)	5,4 (0,54 - 53,89)	0,150
CC	AA	GG	3 (3)	1 (1)	18 (0,81 - 399)	0,067
CC	AC	AA	8 (8)	7 (5)	6,85 (0,65 - 71,72)	0,108
CC	AC	AG	11 (12)	25 (18)	2,64 (0,28 - 24,61)	0,394
CC	AC	GG	6 (6)	7 (5)	5,14 (0,47 - 55,64)	0,177
CC	CC	AA	0	2 (1)	0,86 (0,02 - 29,21)	0,936
CC	CC	AG	5 (5)	5 (4)	6 (0,51 - 69,75)	0,152
CC	CC	GG	2 (2)	3 (2)	4 (0,25 - 63,9)	0,327
CT	AC	AA	4 (4)	6 (4)	4 (0,33 - 47,11)	0,270
CT	AC	AG	11 (12)	20 (14)	3,3 (0,30 - 31,03)	0,296
CT	AC	GG	5 (5)	3 (2)	3,3 (0,30 - 36,11)	0,322
CT	AC	AA	3 (3)	5 (4)	3,6 (0,27 - 46,36)	0,325
CT	AC	AG	9 (9)	16 (11)	3,37 (0,34 - 32,63)	0,293
CT	AC	GG	6 (6)	8 (6)	4,5 (0,42 - 47,99)	0,213
TT	CC	AA	2 (2)	0	21,6 (0,64 - 73,0)	0,086
TT	CC	AG	6 (6)	6 (4)	6 (0,54 - 66,17)	0,143
TT	CC	GG	4 (4)	5 (4)	4,8 (0,39 - 58)	0,217

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

#### 4.2.1. *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizmi u odnosu na starosnu dob majke

Za potrebe analize učestalosti genotipova pojedinačnih polimorfizama kao i njihovih kombinacija u odnosu na starosnu dob majki, ispitivana i kontrolna grupa podijeljene su u dvije dobne skupine; mlađe ( $\leq 36$  godina) i starije ( $> 36$  godina) majke. Dobne skupine određene su primjenom ROC (engl. Receiver Operating Characteristic) metode (slika 5). Utvrđeno je da dob majke  $> 36$  godina kao kriterijska vrijednost s najvećom preciznošću odjeljuje majke koje će imati dijete s DS-om od onih koje neće.



Slika 5 . ROC analiza za dob majke

U ovom dijelu analize učestalosti genotipova s obzirom na starosnu dob (dobna skupina), spojili smo sljedeće genotipove; *MTHFR* 677CT sa 677TT te *MTHFR* 1298AC s 1298CC. Kod *MTRR* A66G polimorfizma spojili smo genotip 66AA sa 66AG. Učestalost alela i genotipova *MTHFR* C677T kao i *MTHFR* A1298C polimorfizama u majki djece s DS-om i majki kontrolne grupe nije se statistički značajno razlikovala ovisno o dobnoj skupini ( $P > 0,05$ ) (tablica 21 i 22). U tablici 23 prikazana je učestalost alela i genotipova *MTRR* A66G polimorfizma, koja se nije statistički razlikovala u majki djece s DS-om i majki kontrolne grupe ovisno o dobnoj skupini ( $P > 0,05$ ).

Tablica 21. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141) u odnosu na dobne skupine

	Mlađe majke (≤ 36 godina)				Starije majke (> 36 godina)			
	Ispitanice (N = 70)	Kontrola (N = 121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N = 25)	Kontrola (N = 20)	OR (95%CI)	P
Genotip	N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
CC	31 (44)	56 (46)	Referentni genotip		14 (56)	10 (50)	Referentni genotip	
CT+TT	39 (56)	65 (54)	1,08 (0,59 - 1,95)	0,789	11 (44)	10 (50)	0,78 (0,24 - 2,55)	0,688
Alel								
C	92 (66)	166 (69)	Referentni alel		36 (72)	30 (75)	Referentni alel	
T	48 (34)	76 (31)	1,13 (073 - 1,77)	0,562	14 (28)	10 (25)	1,16 (0,45 - 3,00)	0,749

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 22. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141) u odnosu na dobne skupine

	Mlađe majke (≤ 36 godina)				Starije majke (>36 godina)			
	Ispitanice (N = 70)	Kontrola (N = 121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N = 25)	Kontrola (N = 20)	OR (95%CI)	P
Genotip	N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
AA	36 (51)	53 (44)	Referentni genotip		9 (36)	10 (50)	Referentni genotip	
AC+CC	34 (49)	68 (56)	0,73 (0,40 - 1,32)	0,309	16 (64)	10 (50)	1,77 (0,53 - 5,89)	0,346
Alel								
A	101 (73)	167 (70)	Referentni alel		32 (64)	27 (68)	Referentni alel	
C	39 (27)	75 (30)	0,85 (0,54 - 1,36)	0,519	18 (36)	13 (32)	1,16 (0,48 - 2,81)	0,728

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 23. Učestalost genotipova i alela *MTRR* A66G polimorfizma u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141) u odnosu na dobne skupine

	Mlađe majke (≤ 36 godina)				Starije majke (> 36 godina)			
	Ispitanice (N = 70)	Kontrola (N = 121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N = 25)	Kontrola (N = 20)	OR (95%CI)	P
Genotip	N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
AA+AG	52 (74)	91 (75)	Referentni genotip		17 (68)	17 (85)	Referentni genotip	
GG	18 (26)	30 (25)	1,05 (0,53 - 2,06)	0,887	8 (32)	3 (15)	2,66 (0,60 - 11,86)	0,196
Alel								
A	65 (47)	115 (48)	Referentni alel		22 (44)	19 (48)	Referentni alel	
G	75 (53)	127 (52)	1,04 (0,68 - 1,58)	0,836	28 (56)	21 (52)	1,15 (0,49 - 2,65)	0,740

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizma u mlađoj i starijoj grupi majki djece s DS-om u odnosu na kontrolnu skupinu nisu se statistički razlikovale ( $P > 0,05$ ) (tablica 24).

Učestalost kombinacija genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G kao i *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G nisu se statistički značajno razlikovale u mlađih kao ni u starijih majki djece s DS-om s obzirom na kontrolnu skupinu ( $P > 0,05$ ) (tablica 25 i 26).

Tablica 24. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141) u odnosu na dobne skupine

		Mlađe majke (≤ 36 godina)				Starije majke (> 36 godina)			
<i>MTHFR</i> 677T	<i>MTHFR</i> 1298C	Ispitanice (N = 70)	Kontrola (N = 121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N = 25)	Kontrola (N = 20)	OR (95%CI)	P
Genotip		N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
CC	AA	9 (13)	15 (12)	Referentni genotip		4 (16)	2 (10)	Referentni genotip	
CC	AC+CC	22 (31)	41 (34)	0,89 (0,33 - 2,37)	0,822	10 (40)	8 (40)	0,62 (0,09 - 4,32)	0,634
CT+TT	AA	18 (26)	27 (22)	1,11 (0,40 - 3,07)	0,839	2 (8)	8 (40)	0,50 (0,03 - 6,68)	0,600
CT+TT	AC+CC	21 (30)	38 (31)	0,92 (0,34 - 2,46)	0,869	9 (36)	2 (10)	2,25 (0,22 - 22,4)	0,487

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 25. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141) u odnosu na dobne skupine

		Mlađe majke (≤ 36 godina)				Starije majke (> 36 godina)			
<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTRR</i> A66G	Ispitanice (N = 70)	Kontrola (N = 121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N = 25)	Kontrola (N = 20)	OR (95%CI)	P
Genotip		N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
CC	AA+AG	25 (36)	47 (39)	Referentni genotip		9 (36)	8 (40)	Referentni genotip	
CC	GG	6 (8)	9 (7)	1,25 (0,4 - 3,92)	0,698	5 (20)	2 (10)	2,22 (0,33 - 14,89)	0,409
CT+TT	AA+AG	27 (39)	44 (37)	1,15 (0,58 - 2,28)	0,681	8 (32)	9 (45)	0,79 (0,20 - 3,03)	0,731
CT+TT	GG	12 (17)	21 (17)	1,07 (0,45 - 2,53)	0,870	3 (12)	1 (5)	2,66 (0,22 - 31,07)	0,433

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 26. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N = 141) u odnosu na dobne skupine

		Mlađe majke (≤ 36 godina)				Starije majke (> 36 godina)			
<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Ispitanice (N = 70)	Kontrola (N = 121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N = 25)	Kontrola (N = 20)	OR (95%CI)	P
Genotip		N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
AA	AA+AG	27 (38)	39 (32)	Referentni genotip		6 (24)	9 (45)	Referentni genotip	
AA	GG	9 (13)	14 (11)	0,92 (0,35 - 2,45)	0,881	3 (12)	1 (5)	4,5 (0,37 - 54,15)	0,236
AC+CC	AA+AG	25 (36)	52 (43)	0,69 (0,35 - 1,37)	0,296	11 (44)	8 (40)	2,06 (0,52 - 8,17)	0,302
AC+CC	GG	9 (13)	16 (13)	0,81 (0,31 - 2,10)	0,669	5 (20)	2 (10)	3,75 (0,53 - 26,04)	0,181

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti



U tablici 27 prikazana je učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om i majki zdrave djece u odnosu na dvije dobne skupine ( $\leq 36$  i  $> 36$  godina). Nije utvrđena statistički značajna razlika u frekvenciji genotipova za sva tri polimorfizma zajedno.

Tablica 27. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) i majki zdrave djece (N=141) u odnosu na dobne skupine

MTHFR C677T	MTHFR A1298C	MTRR A66G	Mlađe majke ( $\leq 36$ godina)				Starije majke ( $> 36$ godina)			
			Ispitanice (N=70)	Kontrola (N=121)	OR (95%CI)	P	Ispitanice (N=25)	Kontrola (N=20)	OR (95%CI)	P
Genotip			N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
CC	AA	AA+AG	7 (10)	14(11)	Referentni genotip		3(12)	2(10)	Referentni genotip	
CC	AA	GG	2 (3)	1(1)	4,0 (0,30-52,06)	0,289	1(4)	0	2,14(0,05-77,54)	0,677
CC	AC+CC	AA+AG	18 (26)	33(27)	1,09 (0,37-3,19)	0,873	6(24)	6(30)	0,66 (0,08-5,53)	0,707
CT+TT	AA	AA+AG	20 (28)	25(20)	1,6 (0,54-4,71)	0,394	3(12)	7(35)	0,28 (0,03-2,69)	0,273
CT+TT	AA	GG	7 (10)	13(11)	1,07(90,29-3,91)	0,910	2(8)	1(5)	1,33(0,06-26,61)	0,850
CT+TT	AC+CC	AA+AG	7 (10)	19(16)	0,73 (0,21-2,58)	0,633	5(20)	2(10)	1,66(0,14-18,87)	0,680
CC	AC+CC	GG	4 (6)	8(7)	1,0 (0,22-4,50)	1,000	4(16)	2(10)	1,33(0,11-15,70)	0,819
CT+TT	AC+CC	GG	5 (7)	8(7)	1,25 (0,29-5,2)	0,761	1(4)	0	2,14(0,05-77,54)	0,677

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

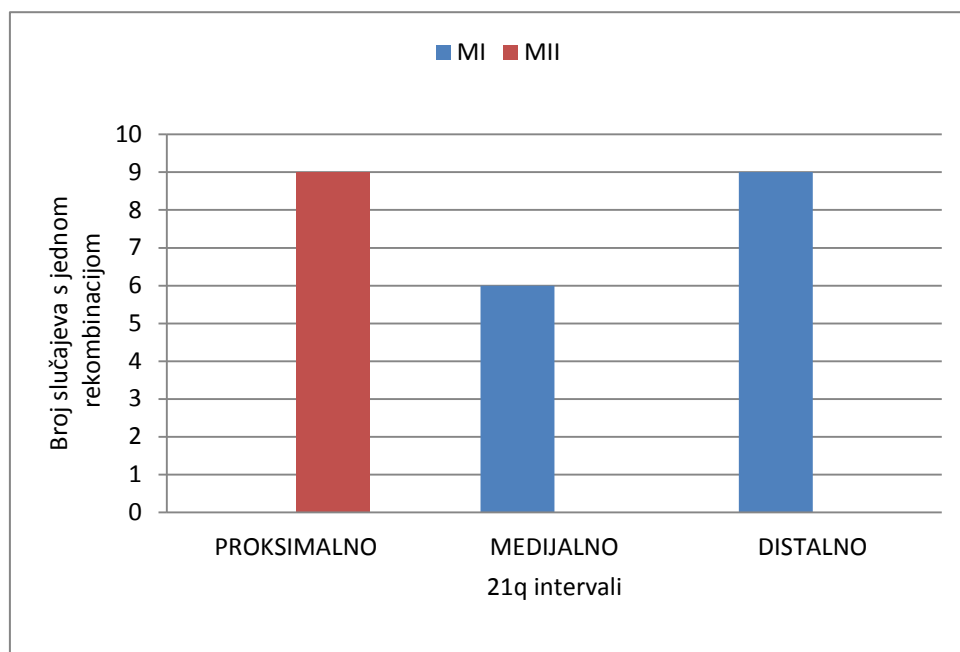
### 4.3. Analiza rekombinacije

Analiza broja rekombinacija izvršena je na uzorku djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla i njihovih majki (N=95). Rezultati su prikazani u tablici 28. U 79% (65/82) slučajeva MI nerazdvajanja utvrđen je potpuni izostanak rekombinacija.

Tablica 28. Učestalost broja rekombinacija u majki djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla (N = 95)

Mejotička dioba	0 rekombinacija N (%)	1 rekombinacija N (%)	2 rekombinacije N (%)
MI (N = 82)	65 (79)	15 (18)	2 (3)
MII (N = 13)		9 (70)	4 (30)

Položaj rekombinacije određivan je unutar tri zadana intervala (proksimalni, medijalni i distalni) dugog kraka kromosoma 21. U trisomija 21 nastalih nerazdvajanjem kromosoma u MI i s jednom rekombinacijom, u 60% (9/15) slučajeva rekombinacija je utvrđena u distalnom dijelu kromosoma, a u 40% (6/15) slučajeva u medijalnom dijelu dugog karaka kromosoma 21. U trisomija 21 nastalih nerazdvajanjem kromosoma u MII (9/9) i s jednom rekombinacijom u svim slučajevima rekombinacija je utvrđena u proksimalnom intervalu dugog karaka kromosoma 21 (slika 6).



Slika 6. Položaj rekombinacije u slučajevima s utvrđenom jednom rekombinacijom

Dvije rekombinacije detektirane su u dva slučaja s nerazdvajanjem kromosoma u MI. U prvom slučaju obje rekombinacije smještene su u medijalnom intervalu dugog kraka kromosoma 21, a u drugom slučaju jedna rekombinacija smještena je u medijalnom, a druga u distalnom dijelu kromosoma 21.

U slučajevima s nerazdvajanjem kromosoma u MII, po dvije rekombinacije detektirane su u četiri slučaja. U tri slučaja jedna je rekombinacija smještena u proksimalnom, a druga u medijalnom intervalu dugog kraka kromsoma 21, a u četvrtom slučaju jedna je rekombinacija smještena u proksimalnom, a druga u distalnom intervalu.

#### 4.3.1. Rekombinacija i starosna dob majke

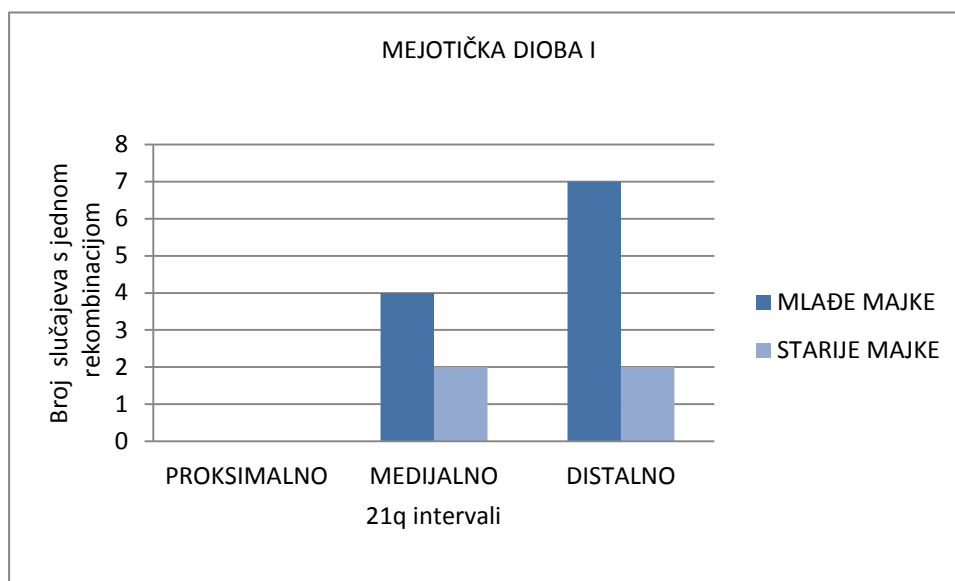
U tablici 29 prikazana je učestalost broja rekombinacija u odnosu na dvije dobne skupine majki ( $\leq 36$  i  $> 36$  godina) i mejotičku diobu u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21. Učestalost broja rekombinacija (0 i 1 rekombinacija) u MI nije se statistički značajno razlikovala ovisno o dobnoj skupini ( $P > 0,05$ ). Učestalost broja rekombinacija (1 ili 2 rekombinacije) u MII diobi nije se statistički značajno razlikovala ovisno o dobnoj skupini ( $P > 0,05$ ).

Tablica 29. Učestalost broja rekombinacija s obzirom na dobnu skupinu majki djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla

Mejotička dioba	Dobna skupina	0 rekombinacija N (%)	1 rekombinacija N (%)	P	2 rekombinacije N (%)	P
MI	$\leq 36$	48 (79)	11 (18)	0,599	2 (3)	
	$> 36$	17 (81)	4 (19)		0	
MII	$\leq 36$	0	6 (70)		3 (30)	0,646
	$> 36$	0	3 (74)		1 (26)	

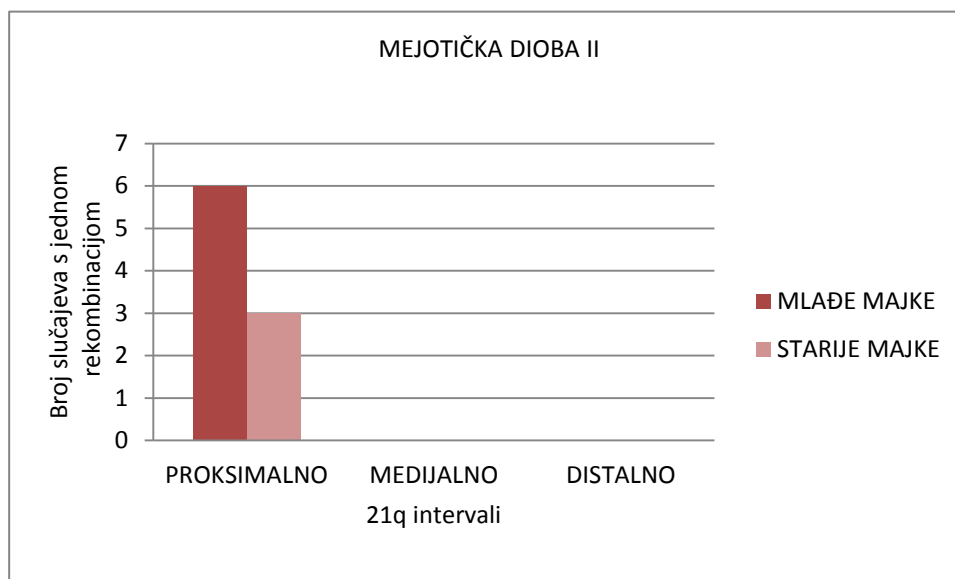
Slika 7 prikazuje položaj jedne rekombinacije, duž dugog kraka kromosoma 21, u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, podijeljenih prema dobnim skupinama ( $\leq 36$  i  $> 36$  godina). Distalni položaj rekombinacije detektiran je u 63% (7/11) majki mlađe dobne skupine te u 50% (2/4) majki starije dobne skupine ( $P = 0,538$ ). Medijalni položaj rekombinacije detektiran je 37% (4/11) majki mlađe dobne skupine te u 50% (2/4) majki starije dobne skupine ( $P = 0,538$ ). Analizom linearne regresije nije utvrđena povezanost

starosne dobi majke s položajem rekombinacije u majki kod kojih se nerazdvajanje kromosoma dogodilo u MI i s utvrđenom jednom rekombinacijom (N = 15) ( $t = -1,07$ ,  $p = 0,303$ ).



Slika 7. Položaj jedne rekombinacije u majki s nerazdvajanjem kromosoma 21 u MI s obzirom na dobnu skupinu

Slika 8 prikazuje položaj jedne rekombinacije duž dugog kraka kromosoma 21, u majki djece s DS-om, kod kojih se nerazdvajanje kromosoma dogodilo u MII, podijeljenih prema dobnim skupinama ( $\leq 36$  i  $> 36$  godina). Rekombinacija u proksimalnom dijelu kromosoma 21 detektirana je u svim slučajevima bez obzira na starosnu dob ( $P > 0,05$ ).



Slika 8. Položaj jedne rekombinacije u majki s nerazdvajanjem kromosoma 21 u MII s obzirom na dobnu skupinu

#### 4.4. *MTHFR* C677T/A1298C, *MTRR* A66G polimorfizmi, dioba nerazdvajanja kromosoma 21, broj i položaj rekombinacije

Rezultati analize učestalosti genotipova i alela *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 95) ovisno o mejotičkoj diobi u kojoj je došlo do nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 prikazani su u tablicama 30, 31 i 32. Frekvencija genotipova i alela *MTHFR* C677T/A1298C kao i *MTRR* A66G polimorfizma nije bila statistički značajno različita u ispitivanih grupa ( $P > 0,05$ ).

Tablica 30. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTHFR</i> C677T	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
	MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip	N (%)	N (%)		
CC	36 (43)	9 (69)	Referentni genotip	
CT+TT	46 (56)	4 (31)	2,87 (0,81-10,09)	0,099
Alel				
C	107 (65)	21 (85)	Referentni alel	
T	57 (35)	4 (15)	2,79 (0,91-8,54)	0,071

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 31. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTHFR</i> A1298C	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
	MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip	N (%)	N (%)		
AA	39 (48)	6 (46)	Referentni genotip	
AC+CC	43 (52)	7 (54)	0,94 (0,29 - 3,05)	0,924
Alel				
A	116 (71)	17 (65)	Referentni alel	
C	48 (29)	9 (35)	0,78 (0,32 - 1,87)	0,581

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 32. Učestalost genotipova i alela *MTRR* A66G polimorfizma u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTRR</i> A66G	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
	MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip	N (%)	N (%)		
AA +AG	59 (72)	10 (77)	Referentni genotip	
GG	23 (28)	3 (23)	1,29 (0,32 - 5,15)	0,709
Alel				
A	75 (46)	12 (46)	Referentni alel	
G	89 (54)	14 (54)	1,01 (0,44 - 2,33)	0,968

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Rezultati analize učestalosti kombinacije genotipova polimorfizama (*MTHFR* C677 i A1298C, *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G te *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G) u majki djece s DS-om u odnosu na MI i MII diobu u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma prikazani su u tablicama 33, 34 i 35. Učestalost kombinacije genotipa *MTHFR* 677CT+TT/*MTRR* 66AA+AG u majki kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI u odnosu na one s nerazdvajanjem kromosoma u MII, na granici je statističke značajnosti ( $P = 0,051$ ) (tablica 34). Za ostale kombinacije genotipova nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti ovisno o mejotičkoj diobi ( $P > 0,05$ ).

U tablici 36 prikazana je učestalost kombinacije genotipova svih triju ispitivanih polimorfizama (*MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G) u majki djece s DS-om u odnosu na mejotičku diobu u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma 21. Frekvencija ispitivanih kombinacija genotipova nije se statistički značajno razlikovala između MI i MII diobe ( $P > 0,05$ ).



Tablica 33. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizma u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
		MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip		N (%)	N (%)		
CC	AA	10 (12)	3 (23)	Referentni genotip	
CC	AC+CC	26 (32)	6 (46)	1,3 (0,27-6,22)	0,742
CT+ TT	AA	29 (35)	3 (23)	2,9 (0,5-16,76)	0,234
CT+ TT	AC+CC	17 (21)	1 (8)	5,1 (0,46-55,89)	0,182

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 34. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizma u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTRR</i> A66G	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
		MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip		N (%)	N (%)		
CC	AA +AG	26 (32)	8 (62)	Referentni genotip	
CC	GG	10 (12)	1 (8)	3,07 (0,33-27,85)	0,317
CT+ TT	AA+ AG	33 (40)	2 (15)	5,07 (0,99-25,97)	0,051
CT+ TT	GG	13 (16)	2 (15)	2,00 (0,37-10,80)	0,420

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 35. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G polimorfizma u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
		MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip		N (%)	N (%)		
AA	AA+AG	29 (35)	4 (31)	Referentni genotip	
AA	GG	10 (12)	2 (15)	0,68 (0,10-4,35)	0,692
AC+ CC	AA +AG	30 (37)	6 (46)	0,68 (0,17-26,9)	0,593
AC+ CC	GG	13 (16)	1 (8)	1,79 (0,18-17,62)	0,616

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 36. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G u majki djece s DS-om ovisno o mejotičkoj diobi (MI/MII)

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Mejotička dioba		OR (95%CI)	P
			MI (N = 82)	MII (N = 13)		
Genotip			N (%)	N (%)		
CC	AA	AA+AG	7 (9)	3 (23)	Referentni genotip	
CC	AA	GG	3 (4)	0	3,26 (0,13 - 82,04)	0,471
CC	AC+CC	AA+AG	19 (23)	5 (38)	1,62 (0,30 - 8,67)	0,567
CT+TT	AA	AA+AG	22 (27)	1 (8)	9,42 (0,84- 105,09)	0,068
CT+TT	AA	GG	7 (9)	2 (15)	1,50 (0,18 - 11,92)	0,701
CT+TT	AC+CC	AA+AG	11 (13)	1 (8)	4,71 (0,40 - 54,82)	0,215
CC	AC+CC	GG	7 (9)	1 (8)	3 (0,24 - 36,32)	0,387
CT+TT	AC+CC	GG	6 (7)	0	6,06 (0,26 - 140)	0,261

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Rezultati analize učestalosti genotipova i alela *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om (N = 80) ovisno o broju rekombinacija prikazani su u tablicama 37, 38 i 39. Analizom su obuhvaćeni svi slučajevi nerazdvajanja kromosoma u MI diobi, a statistička značajnost se računala između slučajeva s jednom utvrđenom rekombinacijom i bez rekombinacije. Frekvencija genotipova i alela *MTHFR* C677T/A1298C kao i *MTRR* A66G polimorfizma nije bila statistički značajno različita u ispitivanih grupa (P > 0,05).

Tablica 37. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTHFR</i> C677T	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
	0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip	N (%)	N (%)		
CC	29 (45)	7 (47)	Referentni genotip	
CT+TT	36 (55)	8 (53)	1,08 (0,35 -3,34)	0,885
Alel				
C	84 (65)	21 (70)	Referentni alel	
T	46 (35)	9 (30)	1,27 (0,54 -3,01)	0,576

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 38. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTHFR</i> A1298C	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
	0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip	N (%)	N (%)		
AA	31 (48)	6 (40)	Referentni genotip	
AC+CC	34 (52)	9 (60)	0,73 (0,23-2,29)	0,591
Alel				
A	92 (70)	20 (66)	Referentni alel	
C	38 (30)	10 (34)	0,82 (0,35-1,92)	0,658

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 39. Učestalost genotipova i alela *MTRR* A66G polimorfizma u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTRR</i> A66G	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
	0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip	N (%)	N (%)		
AA +AG	47 (72)	10 (66)	Referentni genotip	
GG	18 (28)	5 (34)	0,76 (0,23-2,55)	0,664
Alel				
A	60 (46)	12 (40)	Referentni alel	
G	70 (54)	18 (60)	0,77 (0,34-1,74)	0,542

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Rezultati analize učestalosti kombinacije genotipova polimorfizama (*MTHFR* C677 i A1298C, *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G te *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G) u majki djece s DS-om u odnosu na broj utvrđenih rekombinacija prikazani su u tablicama 40, 41 i 42.

Tablica 40. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizma u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
		0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip		N (%)	N (%)		
CC	AA	8 (12)	2 (13)	Referentni genotip	
CC	AC+CC	21 (32)	5 (33)	1,05 (0,168-6,55)	0,958
CT+ TT	AA	23 (36)	4 (27)	1,43 (0,21-9,40)	0,704
CT+ TT	AC+CC	13 (20)	4 (27)	0,812 (0,12-5,49)	0,831

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 41. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTRR</i> A66G	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
		0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip		N (%)	N (%)		
CC	AA +AG	22 (34)	4 (27)	Referentni genotip	
CC	GG	7 (11)	3 (20)	0,42 (0,07-2,37)	0,329
CT+ TT	AA+ AG	25 (38)	6 (40)	0,75 (0,18-3,03)	0,695
CT+ TT	GG	11 (17)	2 (13)	1 (0,15-6,32)	1,000

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 42. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
		0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip		N (%)	N (%)		
AA	AA +AG	22 (34)	5 (33)	Referentni genotip	
AA	GG	9 (14)	1 (7)	2,04 (0,20-20,05)	0,538
AC+CC	AA+ AG	25 (38)	5 (33)	1,13 (0,29-4,45)	0,854
AC+CC	GG	9 (14)	4 (27)	0,51 (0,11-2,35)	0,389

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

U tablici 43 prikazani su rezultati analize učestalosti kombinacije genotipova za sva tri polimorfizma (*MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G) ovisno o broju utvrđenih rekombinacija. Frekvencija kombinacije genotipova između ispitivanih grupa nije se statistički značajno razlikovala ( $P > 0,05$ ).

Tablica 43. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na broj rekombinacija

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Rekombinacija		OR (95%CI)	P
			0 rekombinacija (N = 65)	1 rekombinacija (N = 15)		
Genotip			N (%)	N (%)		
CC	AA	AA+AG	5 (8)	2 (13)	Referentni genotip	
CC	AA	GG	3 (5)	0	3,18 (0,11-87,92)	0,494
CC	AC+CC	AA+AG	17 (26)	2 (13)	3,40 (0,37-30,65)	0,275
CT+TT	AA	AA+AG	17 (26)	3 (20)	2,26 (0,29-17,57)	0,433
CT+TT	AA	GG	6 (9)	1 (7)	2,40 (0,16-34,92)	0,521
CT+TT	AC+CC	AA+AG	8 (12)	3 (20)	1,06 (0,12-8,79)	0,952
CC	AC+CC	GG	4 (6)	3 (20)	0,53 (0,05-4,91)	0,579
CT+TT	AC+CC	GG	5 (8)	1 (7)	2,0 (0,13-29,80)	0,615

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

U tablici 44 prikazana je distribucija kombinacije genotipa sva tri polimorfizma (*MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G) s obzirom na položaj rekombinacije. Prikazani rezultati odnose se na slučajeve nerazdvajanja kromosoma u MI diobi i s utvrđenom jednom rekombinacijom. Statistička analiza nije provedena jer se radi o malim uzorcima.

Tablica 44. Distribucija kombinacije genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI, u odnosu na položaj jedne rekombinacije.

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>MTRR</i> A66G	Intervali duž 21q		
Genotip			Proksimalno N	Medijalno N	Distalno N
CC	AA	AA+AG	0	1	1
CC	AC+CC	AA+AG	0	0	2
CT+TT	AA	AA+AG	0	1	2
CT+TT	AA	GG	0	0	1
CT+TT	AC+CC	AA+AG	0	2	1
CC	AC+CC	GG	0	1	2
CT+TT	AC+CC	GG	0	1	0



Povezanost pojedinačnih polimorfizama s mejotičkom diobom (MI i MII) u kojoj je došlo do nerazdvajanja kromosoma (tablica 45), brojem (tablica 46) i položajem rekombinacija (tablica 47) utvrđivana je Spearmanovim rank korelacijskim testom. Statistički značajne razlike nisu utvrđene ( $P > 0,05$ ).

Tablica 45. Korelacija *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om i mejotičke diobe (N = 95)

	Genotip	Spearman R	t (N-2)	P
Mejotička dioba	<i>MTHFR</i> C677T	-0,164	-1,608	0,111
	<i>MTHFR</i> A1298C	0,041	0,397	0,691
	<i>MTRR</i> A66G	-0,006	-0,0065	0,947

Tablica 46. Korelacija *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om i broja rekombinacija (N = 95)

	Genotip	Spearman R	t (N-2)	P
Broj rekombinacija	<i>MTHFR</i> C677T	-0,107	-1,040	0,300
	<i>MTHFR</i> A1298C	0,006	0,066	0,946
	<i>MTRR</i> A66G	0,018	0,177	0,859

Tablica 47. Korelacija *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama u majki djece s DS-om i položaja rekombinacije (N = 30)

	Genotip	Spearman R	t (N-2)	P
Položaj rekombinacije	<i>MTHFR</i> C677T	0,025	0,134	0,893
	<i>MTHFR</i> A1298C	-0,178	-0,959	0,345
	<i>MTRR</i> A66G	0,233	1,268	0,214

#### 4.5. Analiza polimorfizama *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G u očeva djece s DS-om

Analiza učestalosti genotipova i alela *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama obuhvatila je 75 očeva djece s DS-om i kontrolnu skupinu muškaraca (N = 101) čija djeca ne boluju od DS-a.

Analizirane distribucije genotipova podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi za:

- *MTHFR* 677T polimorfizam u skupini očeva djece s DS-om  $p = 0,829$  a u kontrolnoj skupini  $p = 0,875$ ;
- *MTHFR* A1298C polimorfizam u skupini očeva djece s DS-om  $p = 0,085$ , a u kontrolnoj skupini  $p = 0,581$ ;
- *MTRR* A66G u skupini očeva djece s DS-om  $p = 0,725$ , a u kontrolnoj skupini  $p = 0,734$ .

Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u očeva djece s DS-om nije se statistički značajno razlikovala od frekvencije utvrđene u kontrolnoj skupini očeva ( $P > 0,05$ ) (tablica 48).

Statistički značajno veća učestalost *MTHFR* 1298CC genotipa utvrđena je u kontrolnoj skupini očeva ( $p = 0,029$ ) (tablica 49). Učestalost ostalih genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma nisu se statistički značajno razlikovale ( $P > 0,05$ ) (tablica 49).

Učestalost genotipova i alela *MTRR* A66G polimorfizma nije se statistički značajno razlikovala u očeva djece s DS-om i kontrolnoj skupini ( $P > 0,05$ ) (tablica 50).

Tablica 48. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u očeva djece s DS-om (N = 75) i kontrolne skupine očeva (N = 101)

<i>MTHFR</i> C677T	Ispitanici N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
CC	24 (32)	44 (44)	Referentni genotip	
CT	42 (56)	43 (42)	1,79 (0,93 - 3,44)	0,084
TT	9 (12)	14 (14)	1,17 (0,44 - 3,12)	0,740
Alel				
C	90 (60)	131 (65)	Referentni alel	
T	60 (40)	71 (35)	1,23 (0,79 - 1,90)	0,352

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 49. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma u očeva djece s DS-om (N = 75) i kontrolne skupine očeva (N = 101)

<i>MTHFR</i> A1298C	Ispitanici N (%)	Kontrola N (%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
AA	36 (48)	50 (50)	Referentni genotip	
AC	38 (51)	37 (37)	1,42 (0,76 - 2,66)	0,264
CC	1 (1)	14 (13)	0,09 (0,01 - 0,78)	0,029
Alel				
A	110 (73)	137 (68)	Referentni alel	
C	40 (27)	65 (32)	0,76 (0,48 - 1,22)	0,264

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

Tablica 50. Učestalost genotipova i alela *MTRR* A66G polimorfizma u očeva djece s DS-om (N = 75) i kontrolne skupine očeva (N = 101)

<i>MTRR</i> A66G	Ispitanici N(%)	Kontrola N(%)	OR (95%CI)	P
Genotip				
AA	15 (20)	22 (21)	Referentni genotip	
AG	41 (55)	43 (43)	1,39 (0,63 - 0,61)	0,401
GG	19 (25)	36 (36)	0,77 (0,32 - 1,82)	0,559
Alel				
A	71 (47)	7 (43)	Referentni alel	
G	79 (53)	115 (57)	0,84 (0,55 - 1,28)	0,426

OR – engl. odds ratio - omjer izgleda, CI – engl. confidence interval - raspon pouzdanosti

## 5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi je li polimorfizmi gena *MTHFR* (C677T i A1298C) i *MTRR* A66G, pojedinačno ili u kombinaciji, predstavljaju rizične čimbenike za nerazdvajanje kromosoma 21 i to posebno u majki djece s DS-om, i to s obzirom na starosnu dob, mejotičku diobu te broj i položaj rekombinacije. Usprkos velikom interesu za istraživanje polimorfizama gena uključenih u metabolizam folata/homocisteina kao majčinih rizičnih čimbenika za DS, dobiveni rezultati uglavnom su kontradiktorni. Takve razlike moguće je objasniti bitno različitim pristupom istraživanju, što se posebno odnosi na pitanja kao što su: rasna struktura ispitivane populacije, dobna struktura majki djece s DS-om, neusklađenost ispitanica i kontrolne grupe s obzirom na dob i obiteljsku i osobnu anamnezu, te nerijetko mali broj ispitanika. Interesantan je i podatak da je samo u dva rada ispitivanje provedeno isključivo na trisomijama 21 majčinog podrijetla što je važno ako se nastoje utvrditi majčini čimbenici rizika za DS (109,139). To je ujedno bio i razlog što smo u našem istraživanju prvo odredili roditeljsko podrijetlo regularnog tipa trisomije 21. Što se tiče kontrolne grupe, ona je obuhvatila majke koje su imale zdravu djecu i urednu obiteljsku i osobnu anamnezu. Ispitivana i kontrolna grupa bile su usklađene s obzirom na starosnu dob. Valja istaknuti da smo za određivanje dviju dobnih skupina majki koristili ROC metodu i dobili graničnu dob (> 36 godina) koja za naš uzorak najbolje definira mlađu i stariju grupu. Na taj način smo izbjegli proizvoljno, odnosno uobičajeno korištenje dobnih grupa. Nadalje, sve su majke pripadale bijeloj rasi što je još jedna prednost ovog istraživanja. Naime, poznato je da se učestalost polimorfizama može razlikovati ovisno o rasnoj ili etničkoj pripadnosti (86,87,90).

## *Podrijetlo trisomije 21*

U ovom radu je po prvi puta uz primjenu tehnika molekularne genetike određeno roditeljsko podrijetlo regularnog tipa trisomija 21 u hrvatskoj populaciji. Velika većina trisomija 21 bila je majčinog podrijetla (93%). Očevo podrijetlo utvrđeno je u 5%, a mitotsko (postzigotno) u 2% trisomija 21. Dobiveni rezultati u skladu su s općim modelom podrijetla DS-a, odnosno s rezultatima objavljenim za druge populacije (18,20,135,137,140-142). Iako se uzroci trisomije 21 istražuju već čitav niz godina, još uvijek je otvoreno pitanje zašto je DS najčešće majčinog podrijetla (143-145). Oogeneza, kao jedan diskontinuirani proces te s druge strane spermatogeneza, kao kontinuirani proces, predmet su mnogih istraživanja kojima se nastoji objasniti podrijetlo trisomije 21. Analize kromosoma zdravih muškaraca pokazuju da je disomija autosoma prisutna u oko 0,1% spermija (146). S druge strane, u znatno većem postotku utvrđene su aneuploidije oocita, koje se ovisno o starosnoj dobi žene kreću u rasponu od 5 do 50% (144). Hulten i suradnici su u stanicama gonada normalnih fetusa, pobačenih iz socioekonomskih razloga, utvrdili trisomiju 21 u 0,54% stanica ovarija, te u svega 0,01% stanica testisa (38,147). Ova istraživanja potvrđuju da su germinativne stanice žene "sklonije" aneuploidijama nego muške germinativne stanice, što može djelomično objasniti znatno manji udio očevog podrijetla trisomije 21 u odnosu na majčino podrijetlo.

Rezultati dobiveni u našem istraživanju koji se odnose na učestalost nerazdvajanja kromosoma 21 u MI (86%) i MII (14%) diobi oogeneze sukladni su rezultatima studija provedenim u populacijama mediteranskih zemalja te istočne Europe (135,141). Gomez i suradnici nerazdvajanje kromosoma 21 u MI diobi utvrdili su u 90,6%, a 6,2% u MII diobi oogeneze DS-a (135). Machatkova i

suradnici su roditeljsko podrijetlo trisomije 21 obrađivali u populaciji Rusije i Ukrajine. Učestalost nerazdvajanja kromosoma u trisomija 21 majčinog podrijetla kreće se 77,1 - 84,4% u MI, a 14,3 - 9,4% u MII diobi (141). S druge strane Freeman i suradnici, koji su obradili iznimno velik broj slučajeva DS-a (N = 907), nerazdvajanje kromosoma 21 u MI diobi utvrdili su u 72,6%, a 24,6% u MII diobi oogeneze (137). Razlike se, jednim dijelom, mogu objasniti veličinom uzorka, odnosno brojem ispitanika. Naime, što je veći broj ispitanika, rezultati postaju sve sličniji rezultatima Freemana i suradnika. Interesantne rezultate objavili su Allen i suradnici koji su utvrdili da je nerazdvajanje kromosoma 21 češće u MII nego u MI diobi samo u majki najmlađe (<15 godina) i najstarije (40-45 godina) dobne skupine. U dobi 25 - 29 godina omjer nerazdvajanja kromosoma između MI i MII iznosi 3,5, a u dobi 30 - 34 godina taj je omjer 4,7 (23). S obzirom da je srednja vrijednost dobi naših ispitanica iznosila  $31,44 \pm 6,52$  godina te da ih je gotovo 30% bilo u dobnoj skupini 30 - 34 godina, moguće je dobivenu veću učestalost nerazdvajanja u MI diobi objasniti i kao posljedicu dobne strukture našeg uzorka. Gledajući općenito dob majke kao rizični čimbenik za DS, naše je istraživanje potvrdilo ovaj već dobro poznati fenomen jer je statistički značajno viša starosna dob utvrđena u trisomiji 21 majčinog podrijetla nego što je to slučaj s trisomijama očevog ili postzigotnog podrijetla ( $p = 0,010$ ).

Sve navedeno potvrđuje da je starija životna dob majke rizični čimbenik za DS. Studije na eksperimentalnim životinjama kao i kod čovjeka ukazale su na razlike u genskoj ekspresiji između mlađih i starijih oocita (148-151). Geni koji su podložni promjenama uslijed godina uključeni su u regulaciju staničnog ciklusa, kontrolu transkripcije, strukturu citoskeleta, proizvodnju energije i odgovor na stres. Takve promjene mogu dovesti do različitih abnormalnosti diobenog vretena

koje su često uočene u oocitama starijih majki, kao i do destrukcije sestrinskih kromatida ili centromernog kohezijskog kompleksa (27,30,32,152-154). Nadalje, sistem za kontrolu diobenog vretena i pomicanje kromosoma može biti manje efikasan u starijim oocitama (28).

Trisomiju 21 očevog podrijetla determinirali smo u pet slučajeva. Nerazdvajanje kromosoma u prvoj mejotičkoj diobi dogodilo se u dva slučaja, u jednom slučaju u drugoj mejotičkoj diobi, a preostala dva slučaja su bili neinformativni. Prema objavljenim podacima za trisomije 21 očevog podrijetla, omjer MI/MII greške je 0,46 što je značajno različito u usporedbi s greškama nerazdvajanja koje se događaju tijekom oogeneze (42,155). Autori pretpostavljaju da su te razlike odraz različitosti između oogeneze i spermatogene. Prvenstveno se to odnosi na vrijeme događanja prve odnosno druge mejotičke diobe, kao i na različite mehanizme preživljavanja i razdvajanja osjetljivih bivalenata. Mali broj trisomija 21 očevog podrijetla utvrđenih u našem uzorku premalen je za donošenje bilo kakvih zaključaka o uočenom omjeru.

Dob muškaraca u grupi trisomija očevog i postzigotnog podrijetla statistički je značajno niža nego u grupi trisomija majčinog podrijetla ( $p = 0,046$ ). No, ako se uzme u obzir podatak da životna dob oca ne mijenja značajno rizik za DS, onda bi ova razlika u starosnoj dobi očeva bila posljedica prirodnog vezivanja muškaraca i žena približno jednake starosne dobi.

### *Rekombinacija i trisomija 21*

Smatra se da kao rizični čimbenik nerazdvajanja kromosoma 21 u MI diobi oogeneze može biti i promijenjen opći obrazac rekombinacije (*engl. altered*



*recombination*), kao što je izostanak rekombinacije između homolognih kromosoma ili distalni položaj rekombinacije. Pretpostavlja se da je ovakav obrazac rekombinacije rizični čimbenik nerazdvajanja koji nije ovisan o starosnoj dobi majke (47,48). S druge strane, pericentromerni položaj rekombinacije u MII diobi je učestaliji u starijih majki i predstavlja rizični čimbenik ovisan o starosnoj dobi (48,49). U našem ispitivanom uzorku majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI diobi utvrdili smo veći broj slučajeva s izostankom rekombinacije (79%). Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti izostanka rekombinacije među majkama s obzirom na starosnu grupu kojoj pripadaju, čime se podupire teorija o izostanku rekombinacije kao riziku za nerazdvajanje kromosoma neovisnom o starosnoj dobi majke. Iako je naš uzorak za analizu položaja rekombinacije kao rizičnog čimbenika za nerazdvajanje kromosoma u MI diobi premali, ipak je vidljiv trend veće učestalosti distalnog položaja rekombinacije u mlađih (63%) nego u starijih majki (50%). Međutim, u našem ispitivanom uzorku majki djece s DS-om kod kojih se nerazdvajanje kromosoma dogodilo u MII diobi i jednom rekombinacijom, nismo uočili razlike u položaju rekombinacije između mlađe i starije dobne skupine. U obje grupe rekombinacija je bila smještena u pericentromernom dijelu kromosoma. Ovi rezultati nisu u skladu s prije spomenutom teorijom, ali s obzirom da se radi o svega 13 slučajeva, daljnje analize na većem broju ispitanika su neophodne za donošenje konačnih zaključaka o položaju rekombinacije kao mogućem rizičnom čimbeniku za nerazdvajanje kromosoma u MII diobi.

Općenito gledajući, položaj rekombinacija utvrđenih u našem uzorku odgovara raspodjeli koju su uočili Lamb i suradnici (46,47). Smatra se da distalni, telomerni položaj rekombinacije slabije povezuje homologne kromosome od

ostalih te utječe i na orijentaciju kinetohora. Najvjerojatnije, zbog izostanka rekombinacije u proksimalnom dijelu, bivalent sa samo jednom, distalno smještenom rekombinacijom nije sposoban orijentirati kinetohore prema suprotnim polovima (26,156). Proksimalni, pericentromerni položaj rekombinacije predisponirajući je faktor "kromosomskog zaplitanja" što onemogućava razdvajanje homolognih kromosoma u MI diobi pa bivalenti ulaze u metafazu II i tek tada dolazi do njihovog razdvajanja (redukcije) stvarajući gamete s identičnim centromerama. Alternativno, proksimalno smještena rekombinacija može dovesti do prijevremene separacije kromatida u MI diobi. U slučaju da sastrinske kromatide migriraju na isti pol u MI diobi, onda će one imati 50% šanse da u MII diobi putuju zajedno što će prividno rezultirati s MII nerazdvajanjem (19,26). Izostanak rekombinacije moguć je ili zato što se homolozi nisu uspjeli spariti odnosno konjugirati ili je došlo do njihovog sparivanja, ali ne i do rekombinacije. Bez obzira o čemu se radi, takvi ahijazmatski bivalenti nisu uključeni u normalnu segregaciju kromosoma (46).

#### *MTHFR C677T/A1298C i MTRR A66G polimorfizmi i trisomija 21*

Osim rekombinacije, pravilno razdvajanje kromosoma uvjetovano je i drugim genetičkim čimbenicima, ali i okolišnim faktorima. Pretpostavlja se da stabilnost centromerne DNA molekule ovisi o epigenetskom naslijeđu specifičnih centromernih metilacijskih događaja kao i o vezivanju specifičnih metil-senzitivnih proteina koji omogućavaju bolju i jaču povezanost cijelog kinetohornog sistema (157-160). Stoga se smatra da nepravilna i nedovoljna metilacija DNA molekule može biti potencijalni čimbenik rizika za nerazdvajanje kromosoma (91,160).

Upravo bi promjene u metaboličkom putu folata, nastale zbog prisutnosti *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama, mogle biti uzrok hipometilacije pericentromerne regije kromosoma te dovesti do promjena u formiranju kinetohore, a time i do pogrešaka u razdvajanju kromosoma.

Već je u uvodnom dijelu naglašen velik interes istraživača za utvrđivanje povezanosti ovih polimorfizama s trisomijom 21 kao mogućeg majčinog rizičnog čimbenika za DS. Rezultati su uglavnom kontradiktorni. U većini studija provedenim u mediteranskim zemljama nije utvrđen povećan rizik za DS u prisutnosti *MTHFR* C677T polimorfizma (101-109). S druge strane, u zemljama Sjeverne i Južne Amerike, Aziji te Egiptu utvrđeno je da *MTHFR* C677T polimorfizam jeste rizični čimbenik za trisomiju 21(94-98,161). Nadalje, prva objavljena meta-analiza koja je obuhvatila 11 studija nije utvrdila povezanost ovog polimorfizma i rizika za DS (92). Međutim, drugom meta-analizom, koja objedinjuje rezultate 16 studija, ističe se značajan rizik za rađanje djeteta s DS-om ukoliko je majka nositelj 677T alela (162). Kao jedan od mogućih nedostataka ovih radova vidimo i odabir ispitivane grupe koja uključuje ne samo trisomije 21 majčinog, nego i one očevog i postzigotnog podrijetla. Učestalost potonjih, kreće se 5 - 10% što nije zanemariv podatak. Do sada su samo dvije studije ispitivale utjecaj *MTHFR* C677T polimorfizma u grupi trisomija 21 majčinog podrijetla te su utvrdile da on ne predstavlja rizični čimbenik majke za DS (109,139). Naši se rezultati podudaraju s podacima ovih dviju studija. Republika Hrvatska isto kao i Italija, Španjolska i Francuska pripada, jednim svojim dijelom, u mediteransko područje. U svim tim zemljama nije uočeno da je *MTHFR* 677T alel neovisni rizični čimbenik za DS. Izostanak individualnog efekta *MTHFR* 677T alela djelomično se može objasniti mogućim utjecajem mediteranske prehrane, koja je bogata folatima. Republika

Hrvatska je podijeljena u tri regije s obzirom na prehrambene navike stanovništva; to su kontinentalna (istočni, sjeverni i centralni dio), priobalna i grad Zagreb (163). Tradicionalna mediteranska prehrana zastupljena je u priobalnom području. Postoje naznake o promjeni prehrambenih navika stanovništva prema kontinentalnom tipu prehrane, ali ipak stanovništvo priobalnog područja kao i grada Zagreba ima zdrave prehrambene navike. Pod pojmom „zdrave prehrambene navike“ autori smatraju: nekorištenje masti životinjskog podrijetla, uzimanje mlijeka s udjelom masti manjom od 3,2%, konzumiranje voća i izbjegavanje soli. Istraživanje je pokazalo da gotovo četvrtina odraslog stanovništva Hrvatske ima nezdrave prehrambene navike. Međutim, valja naglasiti da se žene zdravije hrane u usporedbi s muškarcima, a posebice to vrijedi za žene priobalne i gorske regije (163). Što se tiče unosa folata i folne kiseline prehranom u žena reproduktivne dobi (srednja dob  $24 \pm 3,7$ ) s područja grada Zagreba, iako je ispod ( $< 180 \mu\text{g}$ ) preporučene dnevne doze ( $400 \mu\text{g}$ ) ipak zbog učestalog konzumiranja dodataka u prehrani nije zabilježen klinički deficit (164). Međutim, kada govorimo o prehrani i njenom utjecaju na smanjivanje ili povećanje efekta prisutnosti polimorfizama gena u metabolizmu folata, valja naglasiti da se najveći postotak nerazdvajanja kromosoma 21 dešava tijekom prve mejotičke diobe u embrionalno doba razvoja ženskog ploda. Ta činjenica u prvi plan stavlja prehrambene navike majčine majke pa bi se utjecaj dodatka folata u prehrani prije i tijekom trudnoće mogao uočiti tek u drugoj generaciji (165). Iako smo u našem istraživanju prikupili podatke o načinu prehrane i perikonceptijskom unosu folata, dobiveni rezultati nisu bili adekvatni za analizu. Naime, ni jedna od majki djece s DS-om nije konzumirala folate u tom razdoblju. Postkonceptijski unos folata, najčešće od 6. ili 8. tjedna trudnoće pa nadalje još je manje interesantan za

analizu ove problematike. Isto tako, ni učestalost unosa hrane bogate folatima tijekom trudnoće nije se statistički značajno razlikovala između ispitanica i kontrolne grupa.

Učestalost alela i genotipova *MTHFR* A1298C nije se statistički značajno razlikovala između naših ispitanica i kontrolne grupe majki. Povezanost ovog polimorfizma s rizikom za DS nije utvrđena u Francuskoj, Italiji, Brazilu te Kini (104,105,111,112,166). Međutim, u nekoliko se studija iznose suprotni rezultati (95,106,110,113). Dvije do sada provedene meta-analize navode da *MTHFR* A1298C polimorfizam ne predstavlja rizični čimbenik za DS (92,162). Do sada nije provedeno ni jedno istraživanje ovog polimorfizma u majki s utvrđenim roditeljskim podrijetlom trisomije 21 pa u ovom slučaju nemamo adekvatne rezultate za usporedbu.

Za razliku od *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama, *MTRR* A66G polimorfizam znatno se manje istraživao. Povezanost ovog polimorfizma s povećanim rizikom za rađanje djeteta s DS-om utvrđena je u nekoliko studija (94,116,117,130). Za razliku od njih studije provedene u Francuskoj, Italiji i Brazilu nisu utvrdile navedenu povezanost (104,106,111,166). Isto su tako i rezultati provedenih meta-analiza kontradiktorni. Naime, u dvije od tri provedene takve studije utvrđeno je da *MTRR* 66G alel predstavlja rizični čimbenik za DS (167,162,92). Do sad su jedino Pozzi i suradnici analizirali ovaj polimorfizam u majki djece s DS-om majčinog podrijetla i utvrdili da postoji povećan rizik za DS ukoliko je majka nosioc *MTRR* 66AG ili 66GG genotipa (109). U našem radu učestalost alela i genotipova *MTRR* A66G polimorfizma nije se statistički značajno razlikovala između majki djece s DS-om i kontrolnih majki ( $P > 0,05$ ). Iako na

granici statističke značajnosti, ovaj polimorfizam u kombinaciji s *MTHFR* C677T pokazuje zanimljiv trend o čemu će kasnije biti više riječi.

Ovim istraživanjem dobiveni su podatci i o učestalosti *MTHFR* C677T i A1298C te *MTRR* A66G polimorfizama u očeva djece s DS-om. Posebno je interesantan podatak dobiven u našem istraživanju, a odnosi se na statistički značajno veću učestalost *MTHFR* 1298CC genotipa u očeva djece s DS-om nego u kontrolnoj grupi ( $P = 0,02$ ). Naime, samo u jednog oca djeteta s trisomijom 21 (1%) detektiran je navedeni genotip, dok ih je u kontrolnoj skupini očeva bilo čak 14 (13%). U kontekstu nerazdvajanja kromosoma 21 teško je objasniti ovaj rezultat jer se radi o ocu djeteta s trisomijom 21 majčinog podrijetla. Eventualno se može razmišljati o protektivnom učinku 1298CC genotipa na preživljavanje fetusa s trisomijom 21 ili o njegovoj povezanosti s nekom od fenotipskih osobina DS-a. Naime, neki autori smatraju da *MTHFR* 1298C alel ima protektivan učinak na kongenitalne srčane greške u djeteta s DS-om (168). Rezultati našeg objavljenog rada ukazuju na manju učestalost prijenosa očevog *MTHFR* 1298C alela na dijete s DS-om i kongenitalnom srčanom greškom (169).

Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizma je podjednaka u očeva djece s DS-om i kontrolne grupe. Prema dostupnoj literaturi samo su Cyril i suradnici analizirali *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizme u očeva djece s DS-om i utvrdili veću učestalost 677CT i 677TT genotipova nego u kontrolnoj grupi u kojoj navedeni genotipovi uopće nisu detektirani. U tom radu učestalost genotipova i alela *MTHFR* A1298C polimorfizma bila je podjednaka u obje ispitivane skupine (98). Podatci koje su dobili Cyril i suradnici zajedno s našim sasvim sigurno, zbog zanimljivosti i jake oprečnosti, ukazuju na potrebu za daljnjim sustavnim ispitivanjem.

S obzirom da su ovim istraživanjem dobiveni prvi podatci o učestalosti *MTHFR* C677T i A1298C kao i *MTRR* A66G polimorfizama u roditelja djece s DS-om u odnosu na roditelje zdrave djece, važno je prokomentirati i podatke koji se odnose na kontrolnu grupu. Učestalost genotipova i alela *MTHFR* C677T polimorfizma u kontrolnoj skupini u skladu je s već objavljenim podacima za hrvatsku populaciju kao i za ostale populacije Europe (86,170). U Europi se uočava porast učestalosti 677TT genotipa od sjevera prema jugu pa se dobivena učestalost *MTHFR* 677TT genotipa (9%) i 677T alela (31%) uklapa u sjever-jug gradijent. Frekvencija *MTHFR* 1298CC genotipa (10%) i 1298C alela (31%) u ispitivanoj kontrolnoj grupi također je u skladu s podacima objavljenim za Europu i općenito za bijelu rasu (86). Ovo su ujedno i prvi podatci o učestalosti ovog polimorfizma za našu populaciju, a to se odnosi i na *MTRR* A66G polimorfizam. Učestalost *MTRR* 66GG genotipa (28%) u skladu je s podacima objavljenim za bijelu rasu (26,7 – 29,9%) (86,171). *MTRR* 66G alel javlja se s učestalošću od 54% slično kao i u drugim europskim zemljama (52 - 57%) (86).

#### *Kombinacija genotipova MTHFR C677T/A1298C i MTRR A66G polimorfizama i trisomija 21*

U našem ispitivanom uzorku učestalost kombinacija genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama nije se statistički značajno razlikovala između majki djece s DS-om majčinog podrijetla i kontrolnih majki. Studije provedene u drugim europskim populacijama isto tako ne potvrđuju povezanost ni jedne od mogućih kombinacija genotipova *MTHFR* polimorfizama s povećanim rizikom za DS (103-106). Nasuprot tome, u nekoliko radova provedenih u brazilskoj populaciji utvrđena je povezanost *MTHFR* 677CT/1298AC kombinacije genotipa s rizikom za

trisomiju 21 (110-112). Tri od mogućih devet kombinacija genotipova *MTHFR* polimorfizama, a to su 677CT/1298CC, 677TT/1298CC i 677TT/1298AC, vrlo su rijetke te ih, kao ni većina drugih autora, nismo utvrdili ni u majki djece s DS-om kao ni u kontrolnoj grupi žena (99,105,112,172). Izuzetak je južni dio Italije, regija Kampanja, gdje je detektirana rijetka kombinacija genotipa 677TT/1298CC u majki djece s DS-om, kao i u kontrolnih majki (106). Rai i suradnici detektirali su sve tri rijetke kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama i to u majki djece s DS-om, ali ni jednu u kontrolnoj grupi (113). Nasuprot njih, Martinez-Frias i suradnici utvrdili su dvije rijetke kombinacije genotipova (677CT/1298CC i 677TT/1298AC) u kontrolnih majki, ali ne i u majki djece s DS-om (173). Zanimljivo je da se kombinacije genotipova 677CT/1298CC, 677TT/1298CC i 677TT/1298AC mnogo češće nađu u spontano pobačenih plodova nego u živorođene djece (174,175). Stoga se smatra da te kombinacije genotipa imaju određeni utjecaj na preživljavanje fetusa (88,173,174). Naime, Ulvik i suradnici postavili su teoriju da stabilnost *MTHFR* enzima ovisi o aminokiselini koja se nalazi u katalitičkoj i regulatornoj domeni enzima što je posljedica prisutnosti određenog alela u *MTHFR* genu na poziciji 677 i 1298 (176,177). Katalitički aktivan enzim je dimer koji nastaje povezivanjem dvaju monomera, od koji svaki ima katalitičku i regulatornu domenu te ovisno o kombinaciji genotipa *MTHFR* gena enzim će biti više ili manje stabilan. Tako stabilnu konfiguraciju enzima čine kombinacija genotipova: 677CC/1298AA, 677CC/1298AC i 677CC/1298CC, dok nestabilnu formu enzima uzrokuju 677CT/1298AA, 677CT/1298AC i 677TT/1298AA kombinacije genotipova. Temeljem te teorije pretpostavlja se da rijetke kombinacije genotipova dovode do stvaranja nestabilnih formi enzima koje doprinose smrtnosti embrija te je to možda razlog njihove vrlo rijetke učestalosti u



živorodjenih. Nadalje, temeljem spomenute teorije može se objasniti i udruživanje alela (engl. allelic association) odnosno neravnoteža vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium: LD) koja postoji između *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama. Naime, alel 677T gotovo se uvijek nalazi u *cis* položaju s alelom 1298A, dok je vrlo rijetko detektiran u tom položaju u odnosu na alel 1298C. Stoga se smatra da je LD 677T i 1298C alela posljedica efekta osnivača populacije (engl. founder effect) (137,178). U našem ispitivanom uzorku nismo detektirali rijetki 677T/1298C haplotip što smo i očekivali s obzirom da nismo detektirali ni jednu rijetku kombinaciju genotipa. Učestalost ostalih haplotipova C-A, C-C, T-A *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizama bila je podjednaka u majki djece s DS-om i kontrolnih majki te je statistička značajnost izostala ( $P > 0,05$ ).

Učestalost kombinacija genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G u našem ispitivanom uzorku majki djece s DS-om nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu ( $P > 0,05$ ). Naši se rezultati najbolje mogu usporediti s rezultatima Pozzi i suradnika koji su analizu ovih polimorfizama proveli na majkama djece s DS-om s određenim roditeljskim podrijetlom trisomije 21. Njihovi rezultati također ukazuju da nema povezanosti ni jedne kombinacije genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizama s povećanim rizikom za DS (109). Neke studije ukazuju na povezanost *MTHFR* 677CT+TT/ *MTRR* 66GG genotipa i povećanog rizika za trisomiju 21 (94,116,117,179) što ukazuje na potrebu za reevaluaciju rezultata obzirom da su u analizi sudjelovale majke djece s DS-om bez obzira na podrijetlo trisomije 21. Nadalje, kombinacije genotipova *MTHFR* A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama do sada uopće nisu analizirane kod majki djece s DS-om majčinog podrijetla, a u našem ispitivanom uzorku sve kombinacije genotipa zastupljene su s podjednakom učestalošću kod ispitanica i majki

kontrolne grupe ( $P > 0,05$ ). Isto tako, ni većina objavljenih radova ne ukazuje da bi neka kombinacija genotipova ovih polimorfizama mogla utjecati na nerazdvajanje kromosoma 21 (93,103,111). Jedino su Martinez-Frias i suradnici utvrdili da kombinacija genotipova *MTHFR1298CC/MTRR66GG* statistički značajno povećava koncentraciju homocisteina kod DS-a majki u odnosu na kontrole (107).

Statistička analiza učestalosti kombinacija genotipova *MTHFR* i *MTRR* polimorfizama u očeva kod kojih je došlo do nerazdvajanje kromosoma 21 nije provedeno s obzirom na mali broj slučajeva trisomije 21 očevog podrijetla. Možemo napomenuti da je samo u jednog oca prisutna kombinacija genotipova s više od dva polimorfizma (*MTHFR 677CT/1298AC/MTRR 66GG*), dok su kod ostalih očeva utvrđene kombinacije genotipova sa samo jednim polimorfizmom i to u heterozigotnom obliku. Analizu učestalosti alela, genotipova i kombinaciju genotipova ovih polimorfizama svakako bi bilo interesantno napraviti na većem broju očeva kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma 21. Zbog općenito malog broja trisomija 21 očevog podrijetla, takav projekt zahtijevao bi internacionalno udruživanje većeg broja centara kako bi se prikupio odgovarajući uzorak.

#### *MTHFR C677T/A1298C i MTRR A66G polimorfizmi, starosna dob majke i trisomija 21*

Starosna dob majke jedan je od najznačajnijih i dobro opisanih rizičnih čimbenika za trisomiju 21. Prevalencija DS-a u živorođene djece ovisna o godinama majke zadržava se na određenoj visini, odnosno platou sve do 30-e godine starosti majke nakon čega eksponencijalno raste do 45-e godine (25). Studije provedene na majkama koje su rodile dijete s DS-om u mlađoj dobi

upućuju na moguću fiziološku starost samog mehanizma stanične diobe i/ili genetičku predispoziciju za nepravilno razdvajanje kromosoma (93,108,114,115,180). Naime, analiza kromosoma limfocita periferne krvi majki djece s DS-om mlađih od 35 godina upotrebom mikronukleus testa, a baziranom na FISH metodologiji, pokazala je značajno veću učestalost mikronukleusa i pojave nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 i 13 u odnosu na kontrolne skupine (114). Takvi rezultati ukazuju da u majki djece s DS-om postoji tendencija ka kromosomskom oštećenju i nerazdvajanju kromosoma ne samo u germinativnim, već i u somatskim stanicama. Ista grupa autora detektirala je veću učestalost mikronukleusa u prisutnosti *MTHFR* 677T alela ( $P = 0,031$ ) te *MTHFR* 1298AA genotipa ( $P = 0,047$ ) u obje ispitivane grupe što ukazuje da ti polimorfizmi možda imaju ulogu u formiranju mikronukleusa u mlađih majki (115). Iz svega navedenoga smatramo da je kod istraživanja polimorfizama *MTHFR* i *MTRR* gena kao mogućih rizičnih čimbenika trisomije 21 potrebno analizirati njihov utjecaj s obzirom na dob majke s time da su posebno interesantne mlađe majke kod kojih je rizik za DS kojeg nosi sama starosna dob smanjen. Stoga smo naše ispitanice podijelili na dvije dobne grupe žena, mlađe i starije od 36 godina. Ova razdioba nije proizvoljno uzeta nego je specifično određena ROC metodom i odgovara našem uzorku kojeg su zajedno činile majke s DS djecom i majke zdrave djece. Većina do sada objavljenih radova uglavnom je uključivala majke svih dobnih skupina, s tim da je samo u nekima napomenut postotak mlađih majki koji se kretao od 50 do 70% (99,101,102,111,113). Imajući u vidu da genotipovi *MTHFR* 677CT i 677TT kao i *MTHFR* 1298AC i 1298CC genotipovi smanjuju aktivnost enzima, iste smo spojili. Za *MTRR* polimorfizam nije poznato kako djeluje na samu aktivnost enzima, ali je utvrđeno da je u prisutnosti *MTRR* 66GG genotipa

potrebno četiri puta više istoimenog proteina za aktivaciju MS-a. Iz tog razloga spojili smo *MTRR* 66AA sa 66AG genotipom i on je predstavljao referentnu kombinaciju genotipa s obzirom na rizični *MTRR* 66GG genotip. Naši su rezultati pokazali da ispitivani polimorfizmi (*MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G), pojedinačno ili u kombinaciji, ne predstavljaju rizični čimbenik za trisomiju 21 kako u mlađoj tako ni u starijoj dobnoj skupini ( $P > 0,05$ ). Naime, dobiveni rezultati za *MTHFR* C677T i A1298C polimorfizam u skladu su s rezultatima objavljenim za područje Italije s izuzetkom pokrajine Kampanja (105,106,109). Proizvoljno određivanje dobnih granica kao i populacijske razlike mogu objasniti suprotne rezultate dobivene za ove polimorfizme (95,113,130,161). Analiza *MTRR* A66G polimorfizama u majki mlađih od 35 godina objavljena je u svega dvije studije (109,130). U prvoj studiji utvrdili su da je *MTRR* 66AG genotip rizični čimbenik za DS, dok je u drugoj studiji to *MTRR* 66GG genotip. Mali broj objavljenih rezultata svakako ukazuje na potrebu za daljnja istraživanja ovog polimorfizma posebno u mlađih majki. Kada je riječ o kombinacijama genotipova ispitivanih polimorfizama u mlađih majki djece s DS-om, samo je u jednoj studiji utvrđena povezanost kombinacije genotipova *MTHFR* 677CT+TT i *MTRR* 66GG s rizikom za DS (130).

#### *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizmi, mejotička dioba i trisomija 21

Jedan od ciljeva ovog rada bio je ispitati utjecaj *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama na nepravilno razdvajanje kromosoma 21 ovisno o mejotičkoj diobi u kojoj je došlo do nerazdvajanja kao mogućih rizičnih čimbenika majke za DS. Osim Kokotasa i suradnika koji su analizirali utjecaj *MTHFR* C677T polimorfizma, drugih radova o tome kao i o utjecaju ostalih polimorfizama nema

(138). U našem uzorku majki djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti *MTHFR* C677T polimorfizma između MI i MII diobe. Dobiveni rezultati u skladu su s objavljenim rezultatima Kokotasa i suradnika (139). Učestalosti ostala dva ispitivana polimorfizma nisu se statistički značajno razlikovale. Međutim, kada se govori o kombinacijama genotipova, utvrdili smo, iako na granici statističke značajnosti, veću učestalost kombinacije genotipa *MTHFR* 677CT+TT/*MTRR* 66AA+GG kod majki djece s DS-om kod kojih se nerazdvajanje kromosoma dogodilo u MI diobi (40%) u odnosu na MII diobu (15%) ( $P = 0,051$ ). S obzirom da je u našoj studiji nerazdvajanje kromosoma u MII utvrđeno u svega 14% ( $N = 13$ ) slučajeva, potrebne su daljnje analize na većem broju ispitanica kako bi se utvrdio stvarni rizik ove kombinacije genotipa za nerazdvajanje kromosoma u MI. Učestalosti ostalih kombinacija genotipova nisu se razlikovale između ispitivanih skupina majki.

#### *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizmi, rekombinacija i trisomija 21

Studije *in vitro* i *in vivo* pokazuju da je DNA metilacija značajan mehanizam za održavanje stabilnosti genoma i da promjena obrasca DNA metilacije dovodi do aneuploidija, strukturnih promjena kromosoma i gubitka konstitucijske heterozigotnosti (182-184). Smatra se da promijenjen obrazac DNA metilacije, koji je uvjetovan promjenama u metabolizmu folata, može utjecati i na obrazac rekombinacije (186,187). Stoga je u ovom istraživanju, po prvi puta do sada, analizirana učestalost alela i genotipova *MTHFR* C677T/A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama, pojedinačno i u kombinacijama, u majki djece s DS-om, kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI diobi, u odnosu na broj i položaj

rekombinacija. Naši rezultati su pokazali da navedeni polimorfizmi ne koleriraju s brojem i položajem rekombinacije te da nema statističke značajne razlike u učestalosti pojedinog alela i genotipa, kao i kombinacije genotipova s obzirom na broj rekombinacija u majki djece s DS-om kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI diobi. Statistička analiza učestalosti kombinacije genotipova *MTHFR C677T/A1298C* i *MTRR A66G* polimorfizama u majki djece s DS-om, kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MI diobi, u odnosu na položaj jedne rekombinacije duž zadanih intervala na dugom kraku kromosoma 21, nije provedena jer se radilo o malom broju slučajeva. Temeljem dobivenih distribucija kombinacija genotipova za sva tri polimorfizma zajedno, uočena je ravnomjerna zastupljenost kombinacija genotipova između terminalnog i medijalnog intervala. Distribuciju polimorfizama u majki kod kojih se dogodilo nerazdvajanje kromosoma u MII diobi u odnosu na položaj rekombinacije nije bilo moguće provesti jer je kod svih majki rekombinacija detektirana u proksimalnom položaju. Ovo su prve analize učestalosti polimorfizama i položaja jedne rekombinacije u majki s nerazdvajanjem kromosoma u MI diobi, te su daljnje analize neophodne za utvrđivanje utjecaja navedenih polimorfizama na sam položaj rekombinacije kao predispozicije za nerazdvajanje kromosoma u MI, odnosno MII diobi.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da *MTHFR C677T/A1298C* i *MTRR A66G* polimorfizmi, pojedinačno ili u kombinaciji, nisu rizični čimbenici za trisomiju 21 majčinog podrijetla. Statistički značajne razlike nisu dobivene u odnosu na starosnu dob majke, mejotičku diobu te broj i položaj rekombinacije. Iako je prednost ovog rada dobar odabir ispitivane i kontrolne grupe te etnička ujednačenost populacije, ipak je mali broj ispitanika bio ograničavajući čimbenik u analizama koje se odnose na MI/MII diobu i rekombinaciju. Posljedica je to

ponajprije nesuradnje očeva djece s DS-om. S ovim problemom susreću se i drugi autori pa se možda baš u tome može naći objašnjenje zašto ima tako malo radova koji se temelje na prethodno utvrđenom roditeljskom podrijetlu trisomije 21. Daljnja bi se istraživanja trebala provoditi baš u tom smjeru, a od velikog značaja bila bi i analiza ovih polimorfizama u nerazdvajanju kromosoma kod očeva. Već same činjenice da starosna dob oca ne predstavlja rizični čimbenik za trisomiju 21 te da je spermatogeneza kontinuirani proces koji započinje u pubertetu dale bi mogućnost dobivanja jasnije slike o utjecaju polimorfizama uključenih u metabolizam folata na nepravilno razdvajanje kromosoma. Studije na oocitama fetusa svakako otvaraju još jedan novi pravac u istraživanju koji bi mogao odgovoriti na pitanje da li polimorfizmi gena uključenih u metabolizam folata imaju utjecaj na stvaranje aneuploidnih oocita i nastajanje trisomije 21.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Sindrom Down odnosno trisomija 21 najčešće nastaje kao posljedica nerazdvajanja kromosoma tijekom oogeneze (93%). Očevo podrijetlo utvrđeno je u 5%, a mitotičko (postzigotno) u 2% slučajeva DS-a regularnog tipa,
2. Trisomije 21 majčinog podrijetla u 86% slučajeva posljedica su nerazdvajanja kromosoma u MI, a 14% u MII diobi,
3. Trisomije 21 očevog podrijetla u 80% slučajeva posljedica su nerazdvajanja kromosoma u MI, a 20% u MII diobi,
4. Majke djece s trisomijom 21 majčinog podrijetla statistički značajno su starije ( $31,44 \pm 6,52$ ) od majki djece s DS-om očevog i postzigotnog podrijetla ( $23,71 \pm 1,79$ ) ( $P = 0,010$ ),
5. U trisomiji 21 majčinog podrijetla s greškom nerazdvajanja u MI diobi izostanak rekombinacije utvrđen je u 79%, a jedna rekombinacija u 18% slučajeva, najčešće distalno smještenih (60%),
6. Pericentromerni položaj rekombinacije u trisomija 21 s greškom razdvajanja kromosoma u MII diobi utvrđen je u svim slučajevima s jednom rekombinacijom,
7. Učestalost broja rekombinacija u MI (0 i 1 rekombinacija) i u MII (1 ili 2 rekombinacije) diobi statistički se značajno ne razlikuje ovisno o dobnoj skupini ( $P > 0,05$ ),
8. Učestalost alela, genotipova i kombinacije genotipova *MTHFR C677T/A1298C* i *MTRR A66G* polimorfizama statistički značajno se ne razlikuje između majki djece s DS-om majčinog podrijetla i majki kontrolne grupe ( $P > 0,05$ ),



9. Učestalost alela, genotipova i kombinacije genotipova *MTHFR* C677T, A1298C i *MTRR* A66G polimorfizama statistički se značajno ne razlikuje između majki djece s DS-om majčinog podrijetla ovisno o starosnoj dobi majke, mejotičkoj diobi i broju i položaju rekombinacije,
10. Učestalost alela i genotipova *MTHFR* C677T i *MTRR* A66G polimorfizma statistički se značajno ne razlikuje između očeva djece s DS-om i kontrolne grupe,
11. U očeva djece s DS-om utvrđena je statistički značajno manja učestalost *MTHFR* 1298CC genotipa (1%) u odnosu na grupu kontrolnih očeva (13%), (P = 0,029)

## 7. LITERATURA

1. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 2004; 5:725-38.
2. Khoshnood B, Greenlees R, Loane M, Dolk H, Committee EPM, Group EW. Paper 2: EUROCAT public health indicators for congenital anomalies in Europe. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011; 91 Suppl 1:S16-22.
3. EUROCAT (database on the Internet), (last updated 06 December 2011; cited 20 January 2012). Available from: <http://www.eurocat.ulster.ac.uk/eurocat>
4. Antonarakis SE, Epstein CJ. The challenge of Down syndrome. *Trend Mol Med* 2006; 12:473-479.
5. Cuckle HS. Primary prevention of Down's syndrome. *Int J Med Sci.* 2005;2:93-9.
6. Freeman SB, Bean LH, Allen EG i sur. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet Med* 2008; 10:173-80
7. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE i sur. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:12031-12036.
8. Pritchard M, Reeves RH, Dierssen M, Patterson D, Gardiner KJ. Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. Washington D.C., September 28-October 1, 2007. *Cytogenet Genome Res* 2008; 121:67-77.
9. Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet* 2006; 2:e50.
10. Lyle R, Bena F, Gagos S i sur. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:454-466.
11. Mao R, Wang X, Spitznagel EL i sur. Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol* 2005; 6:R107.
12. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VL, Fisher EM. Down syndrome--recent progress and future prospects. *Hum Mol Genet* 2009; 18:R75-83.
13. Peters J. Overview of Mammalian Genome special issue on epigenetics. *Mamm Genome* 2009; 20:529-531.

14. Deitz SL, Roper RJ. Trisomic and allelic differences influence phenotypic variability during development of Down syndrome mice. *Genetics* 2011; 189:1487-1495.
15. Sommer CA, Henrique-Silva F. Trisomy 21 and Down syndrome: a short review. *Braz J Biol* 2008; 68:447-452.
16. Lejeune J. Trisomy 21 karyotypes. *Pathol Biol (Paris)* 1963;11:1153-8.
17. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007;13:221-7.
18. Antonarakis SE. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med* 1991; 324:872-876.
19. Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet* 2000; 57:95-100.
20. Antonarakis SE, Avramopoulos D, Blouin JL, Talbot CC, Jr., Schinzel AA. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nat Genet* 1993; 3:146-150.
21. Down syndrome database, Available from: <http://www.ds-health.com/> (last update 01 January 2012, cited 25 January 2012).
22. Gauden ME. Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutat Res* 1992; 296:69-88.
23. Allen EG, Freeman SB, Druschel C i sur. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum Genet* 2009; 125:41-52.
24. Penrose LS. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet* 1993; 27:219-224
25. Morris JK, Alberman E. Trends in Down's syndrome live births and antenatal diagnoses in England and Wales from 1989 to 2008: analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register. *BMJ* 2009; 339:b3794.
26. Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A i sur. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996; 14:400-405.
27. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trend Genet* 2008; 24:86-93.

28. Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 2008; 651:14-29.
29. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985; 70:11-17.
30. Marston AL, Tham WH, Shah H, Amon A. A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* 2004; 303:1367-1370.
31. Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:700-708.
32. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:45-58.
33. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:266-272.
34. Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D. Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *Am J Hum Genet* 2000; 67:395-404.
35. Kline J, Levin B. Trisomy and age at menopause: predicted associations given a link with rate of oocyte atresia. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1992; 6:225-239.
36. van Montfrans JM, Dorland M, Oosterhuis GJ, van Vugt JM, Rekers-Mombarg LT, Lambalk CB. Increased concentrations of follicle-stimulating hormone in mothers of children with Down's syndrome. *Lancet* 1999; 353:1853-1854.
37. Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M i sur. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 2008; 1:21.
38. Hulten MA, Patel S, Jonasson J, Iwarsson E. On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. *Reproduction* 2010; 139:1-9.
39. Ghosh S, Feingold E, Chakraborty S, Dey SK. Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. *Hum Genet* 2010; 127:403-409.
40. Savage AR, Petersen MB, Pettay D i sur. Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1221-1227.
41. Petersen MB, Antonarakis SE, Hassold TJ i sur. Paternal nondisjunction in trisomy 21: excess of male patients. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1691-1695.

42. Oliver TR, Bhise A, Feingold E, Tinker S, Masse N, Sherman SL. Investigation of factors associated with paternal nondisjunction of chromosome 21. *Am J Med Genet A* 2009; 149A:1685-1690.
43. Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet* 2004; 5:413-424.
44. Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:250-255.
45. Warren AC, Chakravarti A, Wong C i sur. Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science* 1987; 237:652-654.
46. Lamb NE, Feingold E, Savage A i sur. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1391-1399.
47. Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am J Hum Genet* 2005; 76:91-99.
48. Oliver TR, Feingold E, Yu K i sur. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet* 2008; 14: 4.
49. Ghosh S, Feingold E, Dey SK. Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations. *Am J Med Genet A* 2009; 149A:1415-1420.
50. Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT. First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 65:194-202.
51. Warren WD, Goringe KL. A molecular model for sporadic human aneuploidy. *Trend Genet* 2006; 22:218-224.
52. Marston AL, Tham WH, Shah H, Amon A. A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* 2004; 303:1367-1370.
53. Ghosh S, Bhaumik P, Ghosh P, Dey SK. Chromosome 21 non-disjunction and Down syndrome birth in an Indian cohort: analysis of incidence and aetiology from family linkage data. *Genet Res* 2010; 92:189-197.
54. Robinson WP, Kuchinka BD, Bernasconi F i sur. Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1011-1019.

folati

55. Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 1999; 129:779-782.
56. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv Nutr* 2012; 3:21-38.
57. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34:75-81.
58. Sauer J, Mason JB, Choi SW. Too much folate: a risk factor for cancer and cardiovascular disease? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12:30-36.
59. Rimm EB, Stampfer MJ. Folate and cardiovascular disease: one size does not fit all. *Lancet* 2011; 378:544-546.
60. McLarnon A. Cancer: Folate prevents gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9 doi: 10.1038/nrgastro.2012.18.
61. Lin J, Zeng R, Luo R. Folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, and risk of esophageal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:2019-2023.
62. Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, Marcon F, Rossi S, Caiola S, Verdina A, Galati R, Cafolla A, Crebelli R. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. *Carcinogenesis* 2003; 24:1097-1103.
63. Coppede F, Grossi E, Migheli F, Migliore L. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. *BMC Med Genomics* 2010; 3:42.
64. Coppede F, Tannorella P, Pezzini I i sur. Folate, Homocysteine, Vitamin B12, and Polymorphisms of Genes Participating in One-Carbon Metabolism in Late-Onset Alzheimer's Disease Patients and Healthy Controls. *Antioxid Redox Signal* 2011; 16: 000–000.
65. Molloy AM, Brody LC, Mills JL, Scott JM, Kirke PN. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85:285-294.
66. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11:e4
67. Stryer L. *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga; 1991, str. 429-433.

68. Goyette P, Pai A, Milos R i sur. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9:652-656.
69. OMIM - Genetic disorder catalog (last updated July 2011; cited 20 January 2012). Available from: <http://omim.org/entry/607093>.
70. Frosst P, Blom HJ, Milos R i sur. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
71. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P i sur. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346:1070-1071.
72. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J i sur. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001; 156:409-415.
73. Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1993; 88:1463-1469.
74. Jongbloet PH, Verbeek AL, den Heijer M, Roeleveld N. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms resulting in suboptimal oocyte maturation: a discussion of folate status, neural tube defects, schizophrenia, and vasculopathy. *J Exp Clin Assist Reprod* 2008; 5:5.
75. Ulrich CM, Potter JD. Folate supplementation: too much of a good thing? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:189-193.
76. Wernimont SM, Clark AG, Stover PJ i sur. Folate network genetic variation, plasma homocysteine, and global genomic methylation content: a genetic association study. *BMC Med Genet* 2011; 12:150.
77. Zuntar I, Topic E, Vukosavic D, Vukovic V, Demarin V, Begonja A, Antoljak N, Simundic AM. Croatian population data for the C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase: frequencies in healthy and atherosclerotic study groups. *Clin Chim Acta* 2003; 335:95-100.
78. Harisha PN, Devi BI, Christopher R, Kruthika-Vinod TP. Impact of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects. *J Neurosurg Pediatr* 2010; 6:364-367.
79. Candito M, Rivet R, Herbeth B i sur. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. *Am J Med Genet A* 2008; 146A:1128-1133.

80. Cunha AL, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RD. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clin Chim Acta* 2002; 318:139-143.
81. Relton CL, Wilding CS, Pearce MS, Laffling AJ, Jonas PA, Lynch SA, Tawn EJ, Burn J. Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population. *J Med Genet* 2004; 41:256-260.
82. Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Volcik KA. Does prenatal screening for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in high-risk neural tube defect pregnancies make sense? *Genet Test* 2002; 6:47-52.
83. Shelke N, Keith L. Folic Acid Supplementation for Women of Childbearing Age versus Supplementation for the General Population: A Review of the Known Advantages and Risks. *Int J Family Med* 2011; 2011:173705.
84. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002; 132:2382S-2387S.
85. Friso S, Choi SW, Girelli D i sur. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:5606-5611.
86. Shi M, Caprau D, Romitti P, Christensen K, Murray JC. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003; 67:545-549.
87. Wilcken B, Bamforth F, Li Z i sur. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003; 40:619-625.
88. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM i sur. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044-1051.
89. Miller JW, Green R, Mungas DM, Reed BR, Jagust WJ. Homocysteine, vitamin B6, and vascular disease in AD patients. *Neurology* 2002; 58:1471-1475.
90. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R i sur. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:701-707.



91. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP i sur. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
92. Zintzaras E. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2007;52:943-53.
93. Coppede F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutat Res* 2009; 682:54-70.
94. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P i sur. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:623-30.
95. Meguid NA, Dardir AA, Khass M, Hossieny LE, Ezzat A, El Awady MK. MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian mothers with Down syndrome children. *Dis Markers* 2008;24:19-26.
96. Wang SS, Qiao FY, Feng L, Lv JJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9:93-9.
97. Sheth JJ, Sheth FJ. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. *Indian Pediatr* 2003;40:115-23.
98. Cyril C, Rai P, Chandra N, Gopinath PM, Satyamoorthy K. MTHFR Gene variants C677T, A1298C and association with Down syndrome: A Case-control study from South India. *Indian J Hum Genet* 2009; 15:60-64.
99. Boduroğlu K, Alanay Y, Koldan B, Tunçbilek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet A* 2004;127:5-10.
100. Takamura N, Kondoh T, Ohgi S i sur. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. *Eur J Nutr* 2004; 43:285-287.
101. Chadeaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jais J, Kamoun P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 2002; 51:766-767.
102. Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR i sur. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:388-390.
103. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G i sur. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated

homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003; 121A:219-224.

104. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C i sur. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 2005;94:166-9.

105. Coppedè F, Marini G, Bargagna S i sur. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. *Am J Med Genet A* 2006;140:1083-91.

106. Scala I, Granese B, Sellitto M i sur. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genet Med* 2006; 8:409-416.

107. Martinez-Frias ML, Perez B, Desviat LR i sur. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet A* 2006; 140:987-997.

108. Coppede F, Migheli F, Bargagna S i sur. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett* 2009; 449:15-19.

109. Pozzi E, Vergani P, Dalprà L i sur. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:636.e1-6.

110. Grillo LB, Acacio GL, Barini R, Pinto W, Jr., Bertuzzo CS. [Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome]. *Cad Saude Publica* 2002; 18:1795-7.

111. da Silva LR, Vergani N, Galdieri Lde C i sur. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet A* 2005; 135:263-267.

112. Acacio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino-Bizzacchi JM, Junior WP. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenat Diagn* 2005; 25:1196-1199

113. Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* 2006;51:278-83.

114. Migliore L, Boni G, Bernardini R i sur. Susceptibility to chromosome malsegregation in lymphocytes of women who had a Down syndrome child in young age. *Neurobiol Aging* 2006; 27:710-716.

115. Coppede F, Colognato R, Bonelli A i sur. Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:2006-2015.
116. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM i sur. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002;107:151-5.
117. Wang SS, Qiao FY, Feng L, Lv JJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9:93-99.
118. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7:33-42.
119. Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA, Schuler-Faccini L. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil. *Dis Markers* 2010; 29:95-101.
120. Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER i sur. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet* 2001; 69:434-439.
121. Leclerc D, Wilson A, Dumas R i sur. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3059-3064.
122. OMIM - Genetic disorder catalog (last updated July 2011; cited 21 January 2012). Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTRR>
123. Leclerc D, Campeau E, Goyette P i sur. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1867-1874.
124. Wilson A, Leclerc D, Saberi F i sur. Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998; 63:409-414.
125. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S i sur. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001; 157:451-456.
126. Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 2001; 276:35558-35563.

127. Wilson A, Platt R, Wu Q i sur. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999; 67:317-323.
128. van der Linden IJ, den Heijer M, Afman LA i sur. The methionine synthase reductase 66A>G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida. *J Mol Med* 2006; 84:1047-1054.
129. Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW i sur. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. *Genet. Epidemiol* 2010; 34: 613–623.
130. Liao YP, Bao MS, Liu CQ, Liu H, Zhang D. Folate gene polymorphism and the risk of Down syndrome pregnancies in young Chinese women. *Yi Chuan* 2010; 32:461-466.
131. Jacques PF, Bostom AG, Selhub J i sur. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2003; 166:49-55.
132. Ensembl Genome Browser, (last updated December 2011; cited 21 January 2008). Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>
133. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:907-915.
134. Crkvenac-Gornik K, Grubic Z, Stingl K, Muzinic D, Brkljacic-Kerhin V, Begovic D. Rapid prenatal diagnosis of numerical aberrations of chromosome 21 and 18 by PCR-STR method. *Coll Antropol* 2007; 31:859-862.
135. Gomez D, Solsona E, Guitart M, Baena N, Gabau E, Egozcue J, Caballin MR. Origin of trisomy 21 in Down syndrome cases from a Spanish population registry. *Ann Genet* 2000; 43:23-28.
136. Pavlinić D, Džijan S, Stipoljev F i sur. Quantitative fluorescent PCR-a rapid approach to prenatal diagnostic of common autosomal aneuploidies. *Croat Chem Acta* 2008; 81: 219-222.
137. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL i sur. The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep* 2007; 122:62-72.
138. Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2003; 48:1-7.

139. Kokotas H, Grigoriadou M, Mikkelsen M, Giannoulia-Karantana A, Petersen MB. Investigating the impact of the Down syndrome related common MTHFR 677C>T polymorphism in the Danish population. *Dis Markers* 2009; 27:279-285.
140. Petersen MB, Mikkelsen M. Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91:199-203.
141. Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M i sur. QF-PCR examination of parental and meiotic origin of trisomy 21 in Central and Eastern Europe. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2005; 53:371-373.
142. Ramirez NJ, Belalcazar HM, Yunis JJ, Quintero LN, Arboleda GH, Arboleda H. Parental origin, nondisjunction, and recombination of the extra chromosome 21 in Down syndrome: a study in a sample of the Colombian population. *Biomedica* 2007; 27:141-8.
143. Vialard F, Boitrelle F, Molina-Gomes D, Selva J. Predisposition to aneuploidy in the oocyte. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:127-135.
144. Fragouli E, Wells D, Delhanty JD. Chromosome abnormalities in the human oocyte. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:107-118.
145. Wang ZB, Schatten H, Sun QY. Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging? *Physiology* 2011; 26:314-325.
146. Templado C, Vidal F, Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:91-99.
147. Hulten MA, Patel SD, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Jonasson J, Iwarsson E. On the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 2010; 3:4.
148. Hamatani T, Falco G, Carter MG i sur. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2263-2278.
149. Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T i sur. Aging of oocyte, ovary, and human reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:117-131.
150. Steuerwald NM, Steuerwald MD, Mailhes JB. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Mol Hum Rep* 2005; 11:623-630.
151. Pan H, Ma P, Zhu W, Schultz RM. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* 2008; 316:397-407.
152. Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J, Hunt PA. Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod* 2002; 17:1171-1180.

153. Barbero JL. Sister chromatid cohesion control and aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:223-233.
154. Homer H. New insights into the genetic regulation of homologue disjunction in mammalian oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:209-222.
155. Fonseka KG, Griffin DK. Is there a paternal age effect for aneuploidy? *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:280-291.
156. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2007;16:203-8.
157. Karpen GH, Allshire RC. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* 1997; 13:489-496.
158. Heit R, Rattner JB, Chan GK, Hendzel MJ. G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. *J Cell Sci* 2009; 122:2957-2968.
159. Sakuno T, Watanabe Y. Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Res.* 2009; 17:239-249.
160. Gopalakrishnan S, Sullivan BA, Trazzi S, Della Valle G, Robertson KD. DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* 2009; 18:3178-3193.
161. Sadiq MF, Al-Refai EA, Al-Nasser A, Khassawneh M, Al-Batayneh Q. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms C677T and A1298C as maternal risk factors for Down syndrome in Jordan. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15:51-57.
162. Medica I, Maver A, Augusto GF, Peterlin B. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome – meta-analysis. *Cent Eur J Med* 2009;4:395-408.
163. Jelinic JD, Pucarin-Cvetkovic J, Nola IA, Senta A, Milosevic M, Kern J. Regional differences in dietary habits of adult Croatian population. *Coll Antropol* 2009; 33 Suppl 1:31-34.
164. Pucarin-Cvetkovic J, Kaic-Rak A, Matanic D i sur. Dietary habits and folate status in women of childbearing age in Croatia. *Coll Antropol* 2006; 30:97-102.
165. Patterson D. Folate metabolism and the risk of Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract* 2008; 12:93-97.
166. Santos-Reboucas CB, Correa JC, Bonomo A i sur. The impact of folate pathway polymorphisms combined to nutritional deficiency as a maternal predisposition factor for Down syndrome. *Dis Markers* 2008; 25:149-157.

167. Rai V. Polymorphism in folate metabolic pathway gene as maternal risk factor for Down syndrome. *Int J Biol Med Res* 2011; 2:1055-1060.
168. Hobbs CA, James SJ, Parsian A i sur. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet* 2006; 43:162-166.
169. Bozovic IB, Vranekovic J, Cizmarevic NS, Mahulja-Stamenkovic V, Prpic I, Brajenovic-Milic B. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011; 53:546-550.
170. Lovricevic I, Franjic BD, Tomicic M i sur. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C --> T genetic polymorphism in 228 Croatian volunteers. *Coll Antropol* 2004; 28:647-654.
171. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y i sur. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet* 2002; 70:758-762.
172. Fintelman-Rodrigues N, Correa JC, Santos JM, Pimentel MM, Santos-Reboucas CB. Investigation of CBS, MTR, RFC-1 and TC polymorphisms as maternal risk factors for Down syndrome. *Dis Markers* 2009; 26:155-161.
173. Martinez-Frias ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2008; 146A:1477-1482.
174. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67:986-990.
175. Callejon G, Mayor-Olea A, Jimenez AJ i sur. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. *Hum Reprod* 2007; 22:3249-3254.
176. Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A i sur. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet* 2007; 121:57-64.
177. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:14853-8.
178. Linnebank M, Homberger A, Nowak-Gottl U, Koch HG. A common haplotype for the 677T thermolabile variant of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombophilic patients and controls. *Hum Mutat* 2002; 20:478.

180. Migliore L, Migheli F, Coppede F. Susceptibility to aneuploidy in young mothers of Down syndrome children. *ScientificWorldJournal* 2009; 9:1052-1060.
182. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT i sur. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011; 26:125-132.
183. Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Duenas-Gonzalez A. The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics* 2008; 9:43-50.
184. Moores CJ, Fenech M, O'Callaghan NJ. Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229:76-88.
185. Matsuzaki K, Deng G, Tanaka H, Kakar S, Miura S, Kim YS. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8564-8569.
186. Lees-Murdock DJ, Walsh CP. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Epigenetics* 2008; 3:5-13.
187. Buard J, de Massy B. Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots. *Tren Genet* 2007; 23:301-309.



## **8. POPIS SKRAĆENICA**

BPB – brom-fenol modriilo

CBS – cistationin  $\beta$ -sintetaza

CI – raspon pouzdanosti

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DS – Down syndrom

Hcy – Homocistein

MI – prva mejotička dioba

MII – druga mejotička dioba

5-metilTHF – N5- metiltetrahidofolat

MS – metionin sintaza

MTHFR – N5,N10-metilentetrahidofolat – reduktaza

MTRR – N5-metiltetrahidofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza

OR – omjer izgleda

PCR – metoda lančana reakcija polimerazom

PCR-STR – metoda lančana reakcija polimerazom – kratka uzastopna ponavljanja

RFC1 – reduced folate carrier

RFLP – metoda restrikcija endonukleazama

SAH – S-adenozilhomocistein

SAM – s-adenozilmetionin

STR – kratki ponavljajući sljedovi, mikrosateliti

TYMS - timidil sintaza

QF-PCR – metoda kvantitativno fluorescentna lančana reakcija polimerazom

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime	<b>Jadranka Vraneković (r. Paravić)</b>
Adresa	Krasica 97, 51 224 Krasica
Telefon	051 651292
Telefaks	
Elektronička pošta, Web adresa	pjadran@medri.hr
Državljanstvo	hrvatsko
Datum rođenja	21.9.1971.
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	270140

### RADNO ISKUSTVO

• Datumi (od – do)	sječanj 1997-lipanj 1997, sječanj 1998-
Ustanova zaposlenja	Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
Naziv radnog mjesta	asistent
Područje rada	biologija i medicinska genetika
• Datumi (od – do)	1996
Ustanova zaposlenja	OŠ Dražice-Jelenje OŠ Čavle
Naziv radnog mjesta	učitelj biologije
Područje rada	biologija

### ŠKOLOVANJE

Datum	19.5.2004.
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Prirodoslovno matematički-fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Zvanje	Magistar znanosti (polje: biologija/stanična i molekularna biologija)
Datum	1996
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Prirodoslovno matematički-fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Zvanje	profesor biologije i kemije

### USAVRŠAVANJE

Godina	2008
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet Rijeka i Škola narodnog zdravlja «Andrija Štampar»
Područje	Umijeće medicinske nastave
Godina	2006
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Institut «Ruđer Bošković»
Područje	Molekularna biologija
Godina	2004
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Institut «Ruđer Bošković»

Područje	Fluorescentna i konfokalna mikroskopija
Godina	2000
Mjesto	Nimes/Bari
Ustanova	Medicinski Fakultet Nimes/Institut za genetiku, Sveučilišta u Bariju
Područje	Klasična i molekularna citogenetika
Godina	1998
Mjesto	Genova- Sestri Levante
Ustanova	Institut za genetiku, Sveučilišta u Genovi
Područje	medicinska genetika
Godina	1997
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Intitut Ruđer Bošković
Područje	molekularna medicina

#### OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik 

Hrvatski jezik
----------------

Strani jezici

Jezik	Engleski
Govori	Vrlo dobro
Piše	Vrlo dobro
Čita	izvrsno

#### SOCIJALNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

timski rad sa suradnicima, edukacija studenata

#### ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Organizacija praktične i terenske nastave, organizacija rada u laboratoriju

#### TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Vještine rada na osobnom računalu:  
Operativni sustavi Windows. Desktop aplikacije: MS Office, Corel, Cytovision

#### VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija, 1988.god.

#### PRIVITCI

Suradnik na znanstvenim projektima:

- 0062017- Brajenović Milić Bojana: PRENATALNI TEST PROBIRA ZA DOWNOV SINDROM I OŠTEĆENJE NEURALNE CIJEVI
- 062-0000000-1349 - Brajenović Milić Bojana: PRENATALNI PROBIR ZA SINDROM DOWN
- 062-0982522-0369 - Buretić Tomljanović Alena: GENETIKA METABOLIZMA FOSFOLIPIDA U SHIZOFRENIJI

Objavljeni znanstveni radovi:

Radovi indeksirani u SCI Expanded bibliografskoj bazi podataka:

- Buretić-Tomljanović, Alena; Vraneković, Jadranka; Rubeša, Gordana; Jonovska, Suzana; Tomljanović, Draško; Šendula-Jengić, Vesna; Kapović, Miljenko; Ristić, Smiljana. HFE mutations and transferrin C1/C2 polymorphism among Croatian patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. Mol Biol Rep 2012;39:2253-8.

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

3. Babić Božović, Ivana; Vraneković, Jadranka; Starčević Čizmarević, Nada; Mahulja-Stamenković, Vesna; Prpić, Igor; Brajenović-Milić, Bojana. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011;53:546-550.

4. Vraneković, Jadranka; Babić Božović, Ivana; Starčević Čizmarević, Nada; Buretić-Tomljanović, Alena; Ristić, Smiljana; Petrović, Oleg; Kapović, Miljenko; Brajenović-Milić, Bojana. Functional inference of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on enzyme stability as a potential risk factor for Down syndrome in Croatia. *Dis Markers* 2010;28:293-298.

5. Nadalin, Sergej; Rubeša, Gordana; Giacometti, Jasminka; Vulin, Mirjana; Tomljanović, Draško; Vraneković, Jadranka; Kapović, Miljenko; Buretić-Tomljanović, Alena. BanI polymorphism of cytosolic phospholipase A2 gene is associated with age at onset in male patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;78:351-360.

6. Brajenović-Milić B, Babić I, Ristić S, Vraneković J, Brumini G, Kapović M. Pregnant Women's Attitudes Toward Amniocentesis Before Receiving Down Syndrome Screening Results. *Womens Health Issues* 2008; 18: 79- 84.

7. Jadranka Vraneković, Bojana Brajenović-Milić, Zlata Modrušan-Mozetić, Ivana Babić, Miljenko Kapović. Severe psychomotor retardation in a boy with a small supernumerary marker chromosome 19p. *Cytogenet Genome Res* 2008;121:298-301.

8. Brajenović-Milić B, Tišlarić D, Bačić J, Paravić J, Slivar A, Kapović M, Košec V, Ristić S, Rajhvajn B. Screening for Down's syndrome and neural tube defect in Croatia – A regional prospective study. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13:367-371.

Radovi indeksirani u Scopus bazi podataka:

1. Pereza, Nina; Buretić-Tomljanović, Alena; Ostojić, Saša; Vraneković, Jadranka; Bićanić, Nenad; Kapović, Miljenko. Izodcentrični X kromosom i složeni mozaicizam 45, X/46, X, idic(X)(q28)/46, XX u bolesnice sa sekundarnom amenorejom, visokim rastom i pretiulošću. *Medicina fluminensis*. 47 2011;47: 107-114.

2. Pereza, Nina; Buretić-Tomljanović, Alena; Vraneković, Jadranka; Ostojić, Saša; Kapović, Miljenko. Sindrom prstenastog kromosoma 18. *Medicina fluminensis* 2010; 46: 208-213.

3. Vraneković J. Primjena tehnika molekularne citogenetike u detekciji kromosomskih promjena. *Medicina* 2004; 42:247-255.

4. Brajenović-Milić B, Vraneković J, Petrović O, Masovčić J, Frković A, Pavešić D, Haller H, Kapović M. Prenatalna dijagnostika—naša iskustva. *Medicina* 2004; 42:276-280.

5. Vraneković J, Brajenović-Milić B, Modrušan-Mozetić Z, kapović M. De novo balanced reciprocal translocation: Two cases (De novo balansirana recipročna translokacija: Prikaz dva slučaja). *Medicina* 2004; 40:286-289.

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

6. Paravić J, Brajenović-Milić B, Tišlarić D, Kapović M, Botica A, Jurcan V, Milotti S. Maternal Serum Screening for Down Syndrome: A Survey of Pregnant Women's Views. *Community Genet* 1999; 2: 109-112.

#### SUDJELOVANJE NA DOMAĆIM SKUPOVIMA

Oralna priopćenja:

Vraneković J, Babić I, Peterlin B, Kapović M, Brajenović-Milic B. Molekularno citogenetička analiza de novo recipročnih translokacija. *Pediatr Croat* 2007; 51:3: 155 – 4. hrvatski kongres iz humane genetike, Malinska – otok Krk, 18.-20. listopada 2007.

Vraneković, Jadranka; Babić Božović, Ivana; Grubić, Zorana; Wagner, Jasenka; Pavlinić, Dinko; Dahoun, Sophie; Bena, Frédérique; Čulić, Vida; Brajenović-Milić, Bojana. Down syndrome: Parental origin, recombination, and maternal age // *7th ISAB conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo clinic lectures in translational medicine*. Zagreb : ISABS, 2011. 275-275.

Poster:

Paravić J, Mažuran N, Tomić M, Papeš D. Utjecaj kalcij-klorida i kalcij-bromida na rast, smrtnost i razmnožavanje vodenog puža *Planorbarius corneus L.* 6.KONGRES BIOLOGA HRVATSKE s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, 22.- 26. rujna 1997, zbornik sažetaka priopćenja, str.377, sažetak 281

Brajenović-Milić B, Paravić J, Kapović M, Bačić J, Frković A. Prenatalni test probira za Downov sindrom i defekt neuralne cijevi. 6.KONGRES BIOLOGA HRVATSKE s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, 22.-26. rujna 1997, zbornik sažetaka priopćenja, str. 93, sažetak 32

Brajenović-Milić B, Paravić J, Ristic S, Kapović M, Bačić J, Frković A, Slivar A. Prenatal screening test for Down syndrome and neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 1998; 6:1:172 – 30<sup>th</sup> annual meeting of the European society of human genetics, Lisbon, Portugal, 10-13 may 1998.

Paravić J, Brajenović-Milić B, Kapović M., Botica A, Jurcan V, Milotti S. Maternal serum screening for Down syndrome: A survey of pregnant women views. *Pediatrics Croatica* 1998; 42: 3: 27 2<sup>nd</sup> Croatian Congress in Human Genetics, Zagreb, Croatia, 21- 24 October 1998

#### SUDJELOVANJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA:

Buretic-Tomljanovic A, Vlastelic I, Ostojić S, Vraneković J, Randic L, Kapović M, Radojčić Badovinac A. Cytogenetic and chromosome Y microdeletion analysis of infertile men from North-Adriatic region of Croatia. *Eur J Hum Genet* 2005; 13:1:107 - European Human Genetics Conference, Prague, Czech Republic, 7-10 May 2005

Vraneković J, Brajenović-Milic B, Kapović M. Identification of supernumerary marker chromosome derived from chromosome 19p. *Chromosome research* 2007, 15; 1; 29 – 6<sup>th</sup> European Cytogenetics Conference, Istanbul, Turkey, 7.-10 July 2007. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Vraneković, Jadranka; Brajenović-Milić, Bojana; Babić-Božović, Ivana; Peterlin, Borut; Kapović, Miljenko; Riegel, Mariluce. De novo balanced translocation t(18 ; 20)(q21.3 ; q12) in a mentally retarded girl // *Chromosome Research / Macgregor, Herbert (ur.)*. Springer, 2009. 49-49 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

**PRETHODNA NASTAVNA ISKUSTVA**

Od 1997. godine iskustvo u dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi, suautorstvo u internim skriptama, iskustvo u informatičkoj i ostalim edukacijskim tehnologijama.

**SUDJELOVANJE U IZVOĐENJU NASTAVE IZ KOLEGIJA:**

1. HUMANE GENSKE BOLESTI - odvija se u okviru modula 9 doktorskog studija BIOMEDICINA, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
2. OSNOVE MOLEKULARNE BIOLOGIJE na doktorskome studiju BIOMEDICINA, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
3. HUMANA GENETIKA za stručni studij MEDICINSKO- LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE
4. MEDICINSKA BIOLOGIJA i MEDICINSKA GENETIKA na sveučilišnom studiju MEDICINE
5. STANIČNA BIOLOGIJA S GENETIKOM na sveučilišnom studiju STOMATOLOGIJE
6. BIOLOGIJA na sveučilišnom studiju SANITARNO INŽINERSTVO
7. MEDICINSKA GENETIKA na sveučilišnom studiju MEDICINE
8. PRIRODOSLOVLJE na sveučilišnom UČITELJSKOM studiju

## Autorstvo i suautorstvo skripata

suautor:

Kapović M, i sur.: BIOLOGIJA I MEDICINSKA GENETIKA (Sažeci vježbi i seminara za studente medicine i stomatologije), Izd. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 1997.

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

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

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

## Članstva:

Hrvatsko biološko društvo, Hrvatsko društvo za humanu genetiku, European Cytogenetics Assosiation,