

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dijana Majstorović

VARIJANTE GENA METABOLIZMA FOLATA I METIONINA U
ETIOLOGIJI PRIROĐENIH SRČANIH GREŠAKA U DOWNOVU
SINDROMU

Doktorski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dijana Majstorović

VARIJANTE GENA METABOLIZMA FOLATA I METIONINA U
ETIOLOGIJI PRIROĐENIH SRČANIH GREŠAKA U DOWNOVU
SINDROMU

Doktorski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jadranka Vraneković

Komentor: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Dijana Majstorović

GENE VARIANTS IN FOLATE AND METHIONINE METABOLISM
IN THE ETIOLOGY OF CONGENITAL HEART DEFECTS IN
DOWN SYNDROME

Doctoral thesis

Mentor: Associate Professor Jadranka Vraneković

Comentor: Associate Professor Mauro Štifanić

Rijeka, 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jadranka Vraneković, prof. biologije i kemije

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić, dipl. ing. biol.

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2024. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Rad ima ___ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Eksperimentalni dio rada je izrađen na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jadranke Vraneković, prof. biologije i kemije i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Maura Štifanića, dipl. ing. biol. u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta "Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba sa sindromom Down" (918.10.0230/uniri.-biomed 18-120). Istraživanje je dijelom financirano sredstvima za financiranje znanstvenih aktivnosti temeljenih na rezultatima kroz programske ugovore Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli i sredstvima fonda za razvoj Sveučilišta.

ZAHVALE

Na kraju ovog putovanja, željela bih se zahvaliti svima onima koji su doprinijeli mom profesionalnom i osobnom razvoju tijekom izrade doktorskog rada.

Prije svega, iznimno sam zahvalna mentorici, izv. prof. dr. sc. Jadranki Vraneković, na prilici da budem dio njenog istraživačkog tima. Hvala na neprocjenjivim savjetima, kontinuiranoj podršci, strpljenju, hrabrosti, prijateljstvu i, najvažnije, kartama za novo putovanje.

Također želim zahvaliti komentoru, izv. prof. dr. sc. Mauru Štifaniću, na podršci u iznalaženju financijske potpore za moj doktorski rad i prilici da budem dio ovog znanstvenog područja.

Posebna zahvala ide dr. sc. Aniti Barišić na velikodušnom prenošenju znanja i stručnosti. Dragi Anita, neizmerno ti hvala što si me održala na površini i uvijek znala naći prave riječi.

Hvala mojoj Željki – rad s tobom bio je zadovoljstvo. Hvala Ivani, Goranki i Davorki na brojnim savjetima i iskrenoj podršci.

Svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, neizmerno hvala. Čak i kada je bilo najteže, dolazak na Zavod bio je poput dolaska na mjesto gdje "*Everybody Knows Your Name*".

Ovaj pothvat ne bi bio moguć bez velikodušne potpore moje matične ustanove, Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli, rektora prof. dr. sc. Marinka Škare i prorektora izv. prof. dr. sc. Valtera Boljunčića, stoga Vam neizmerno hvala.

Osobite zahvale upućujem dr. sc. Moiri Buršić na pomoći pri izradi ilustracija.

Zahvaljujem svim malim i velikim ispitanicima, kao i njihovim roditeljima/skrbnicima.

Na kraju, hvala i svima onima koji su bili dio ovog putovanja i na bilo koji način doprinijeli izradi doktorskog rada.

Ovaj doktorski rad posvećujem roditeljima i mojim sestrama, hvala na korijenima i krilima.

S poštovanjem,

Vaša Dijana

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost između varijanti gena *MTHFR* (rs1801133 i rs1801131), *MTRR* (rs1801394), *DNMT1* (rs2228611), *DNMT3A* (rs1550117) te *DNMT3B* (rs1569686 i rs2424913), pojedinačno ili u kombinaciji, i prirođenih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom.

Ispitanici i metode: U ovom retrospektivnom istraživanju, u ispitivanu skupinu uključeno je 134 ispitanika s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom (DSPSG+), a u kontrolnu skupinu 124 ispitanika s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške (DSPSG-). Analizirani su uzorci genomske DNK iz stanica leukocita periferne krvi i epitela bukalne sluznice, pri čemu je genotipizacija varijanti gena provedena korištenjem metoda lančane reakcije polimerazom i polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata. Za istraživanje genetičke povezanosti genotipova, alela i genetičkih modela s predispozicijom za razvoj prirođenih srčanih grešaka, korišteni su omjeri izgleda i 95 % intervali pouzdanosti, uz statističku značajnost postavljenu na razinu $p < 0,05$.

Rezultati istraživanja: Statistički značajno veća učestalost *DNMT3B* rs2424913 TT genotipa ($p = 0,018$) utvrđena je u DSPSG+ skupini u odnosu na DSPSG- skupinu, doprinoseći 2,24 puta većem izgledu za razvoj PSG-a prema dominantnom genetičkom modelu ($p = 0,019$). Kombinacija genotipova *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTHFR* rs1801133 CT ili *MTHFR* rs1801131 AA povećava izgledu za razvoj PSG-a za 4,53 puta ($p = 0,003$), dok kombinacija genotipova *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTRR* rs1801394 AG povećava za 2,82 puta ($p = 0,025$). *DNMT3B* rs2424913 T alel i TT genotip ($p = 0,018$; $p = 0,028$) te *MTHFR* rs1801133 CT ($p = 0,040$) povezani su sa atrijskim septalnim defektima, dok *MTRR* rs1801394 GG genotip ($p = 0,023$) i alel G ($p = 0,020$) kao i dominantni (AA + AG vs GG) ($p = 0,023$) i kodominantni genetički modeli (AA + AG) ($p = 0,021$) mogući su čimbenici rizika za razvoj atrioventrikularnih septalnih defekata. Nije utvrđena statistički značajna razlika u povezanosti istraživanih varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s obzirom na spol u skupini DSPSG+.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja ukazuju da varijanta gena *DNMT3B* rs2424913, pojedinačno ili u kombinaciji, predstavlja potencijalni čimbenik rizika za razvoj prirođenih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom, osobito onih s atrijskim septalnim defektom.

Ključne riječi: DNK Metiltransferaze; Downov sindrom; Metilentetrahidrofolat reduktaza; Metionin sintetaza reduktaza; Polimorfizam, jednog nukleotida; Srčane greške, prirođene.

SUMMARY

Objectives: The main objective of this study was to determine the association between the gene variants *MTHFR* (rs1801133 and rs1801131), *MTRR* (rs1801394), *DNMT1* (rs2228611), *DNMT3A* (rs1550117) and *DNMT3B* (rs1569686 and rs2424913), individually or in combination, and congenital heart defects (CHDs) in individuals with Down syndrome (DS).

Patients and Methods: In this retrospective study, the study group included 134 individuals with DS and CHD (DSCHD+), while the control group consisted of 124 individuals with DS without CHD (DSCHD-). Genomic DNA samples from peripheral blood leukocytes and buccal epithelial cells were analyzed, and the gene variants were genotyped using the polymerase chain reaction method and restriction fragment length polymorphism. Odds ratios and 95 % confidence intervals were used to examine the genetic association of genotypes, alleles, and genetic models with predisposition to developing CHDs, with statistical significance $p < 0.05$.

Results: A statistically significant higher frequency of the *DNMT3B* rs2424913 TT genotype ($p = 0.018$) was found in the DSCHD+ compared to the DSCHD-, contributing to a 2.24-fold higher probability of developing CHD according to the dominant genetic model ($p = 0.019$). The genotype combinations of *DNMT3B* rs2424913 TT and *MTHFR* rs1801133 CT or rs1801131 AA increased the probability of developing CHD by 4.53-fold ($p = 0.003$), while the combination of *DNMT3B* rs2424913 TT and *MTRR* rs1801394 AG genotypes increased it by 2.82-fold ($p = 0.003$). *DNMT3B* rs2424913 TT and T allele ($p = 0.028$; $p = 0.018$) and *MTHFR* rs1801133 CT ($p = 0.040$) are associated with atrial septal defects, while *MTRR* rs1801394 GG genotype ($p = 0.023$) and G allele ($p = 0.020$), as well as the dominant (AA + AG vs GG) ($p = 0.023$) and codominant genetic models (AA + AG) ($p = 0.021$), are possible risk factors for the development of atrioventricular septal defects. No statistically significant difference was found in the association of the investigated *MTHFR*, *MTRR* and *DNMT* gene variants in relation to gender in the DSPSG+ group.

Conclusion: The results of this study suggest that the *DNMT3B* rs2424913 polymorphism, either individually or in combination, may be a risk factor for CHDs in individuals with DS, particularly those with atrial septal defect.

Keywords: DNA Methyltransferase; Down Syndrome; Heart Defects, Congenital; Methylenetetrahydrofolate reductase; Methionine synthase reductase; Polymorphism, Single Nucleotide.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Downov sindrom	1
1.1.1. Epidemiologija	1
1.1.2. Etiologija	2
1.1.3. Klinička slika	2
1.2. Prirođene srčane greške	3
1.2.1. Epidemiologija	4
1.2.2. Etiologija	5
1.3. Prirođene srčane greške u Downovu sindromu	7
1.3.1. Epidemiologija i etiologija	7
1.3.2. Genetički čimbenici rizika	9
1.3.2.1. Metabolizam folata i metionina.....	10
1.3.2.1.1. Varijante gena metabolizma folata i metionina.....	12
1.3.2.1.2. Varijante gena metilentetrahidrofolat-reduktaze	13
1.3.2.1.3. Varijante gena 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza.....	16
1.3.2.1.4. Varijante gena <i>DNK</i> metiltransferaza	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	21
3. ISPITANICI I METODE.....	22
3.1. Vrsta istraživanja, skupine ispitanika, prikupljanje materijala.....	22
3.2. Metode.....	22
3.2.1. Molekularno-genetička analiza.....	22
3.2.2. Etički aspekti istraživanja	26
3.3. Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI.....	28
4.1. Analiza genotipova i alela gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i> , pojedinačno i u kombinaciji ...	29

4.2. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i> s vrstom prirođene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom	38
4.3. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i> sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom.....	40
5. RASPRAVA.....	44
5.1. Analiza varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i>	46
5.2. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i> s vrstom prirođene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom.....	49
5.3. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i> sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom.....	50
6. ZAKLJUČCI.....	53
7. LITERATURA.....	54
ILUSTRACIJE	78
Popis slika.....	78
Popis tablica.....	78
POPIS POKRATA.....	83
PRIVITCI.....	87
Prilog 1. Čimbenici rizika za prirođene srčane greške u Downovu sindromu	87
Prilog 2. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i nesindromskih prirođenih srčanih grešaka	88
Prilog 3. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i prirođenih srčanih grešaka u Downovu sindromu	95
Prilog 4. Analiza kombinacija varijanti gena.....	97
Prilog 5. Povezanost varijanti gena <i>MTHFR</i> , <i>MTRR</i> i <i>DNMT</i> s vrstom prirođene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom.....	103
ŽIVOTOPIS.....	112

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Prirođene srčane greške (PSG, engl. *Congenital Heart Defects, CHDs*) nalaze se u približno 50 % novorođenčadi s Downovim sindromom u oba spola [1, 2, 3, 4, 5, 6] dok se ista dijagnoza postavlja kod približno 1 % novorođenčadi bez ovog sindroma [7].

Budući da više od 50 % osoba s Downovim sindromom ima normalno građeno srce, PSG se ne mogu smatrati isključivo posljedicom trisomije 21 [8]. Etiologija PSG-a je multifaktorijalna, uključujući genetičke i epigenetičke čimbenike rizika [9, 10, 11, 12, 13]. Dokazi ukazuju na mogući doprinos nedostatnog unosa folata u perinatalnom razdoblju [14] i utjecaj varijanti gena u metabolizmu folata i metionina [15], ali rezultati do danas nisu jednoznačni [16, 17].

Metabolizam folata i metionina predstavlja međusobno povezane cikluse koji sintetiziraju i prenose metilne skupine nužne za različite reakcije metilacije u stanici [18]. Metilacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK, engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*), kao osnovni epigenetički mehanizam, sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih procesa tijekom razvoja organizma [19]. Izmijenjena ekspresija gena kao posljedica nedaekvatnog unosa folata i/ili varijanti gena može rezultirati promjenama u obrascima metilacije DNK. Promijenjen obrazac metilacije DNK predstavlja ključni čimbenik koji utječe na ekspresiju gena relevantnih za razvoj i funkciju srca [20, 21, 22].

1.1. Downov sindrom

1.1.1. Epidemiologija

Downov sindrom (DS, engl. *Down syndrome*), OMIM 190685 (engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*) [23] najčešća je aneuploidija u humanoju populaciji [24]. Nastaje kao posljedica trisomije kromosoma 21 i čini oko 8 % svih kongenitalnih anomalija [25]. Incidencija iznosi približno 1:779, što čini otprilike 12,8 slučajeva na 10,000 živorođenih [26]. Prema izvješću Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2023. godinu u Republici Hrvatskoj registrirano je 2000 osoba s DS-om [27].

Rezultati istraživanja ukazuju na veću zastupljenost muškog spola među osobama s Downovim sindromom, s omjerom spolova (engl. *sex ratio, SR*) = 1,18 [28, 29, 30].

Smrtnost povezana s ovim sindromom kreće se u rasponu od 1,4 do 3,6 % [6]. Prirođene srčane greške predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti kod osoba s DS-om koje su preminule prije 20. godine života, dok su bolesti dišnog i krvožilnog sustava dominantan uzrok kod onih koje su preminule nakon navršene 20. godine života [31, 32].

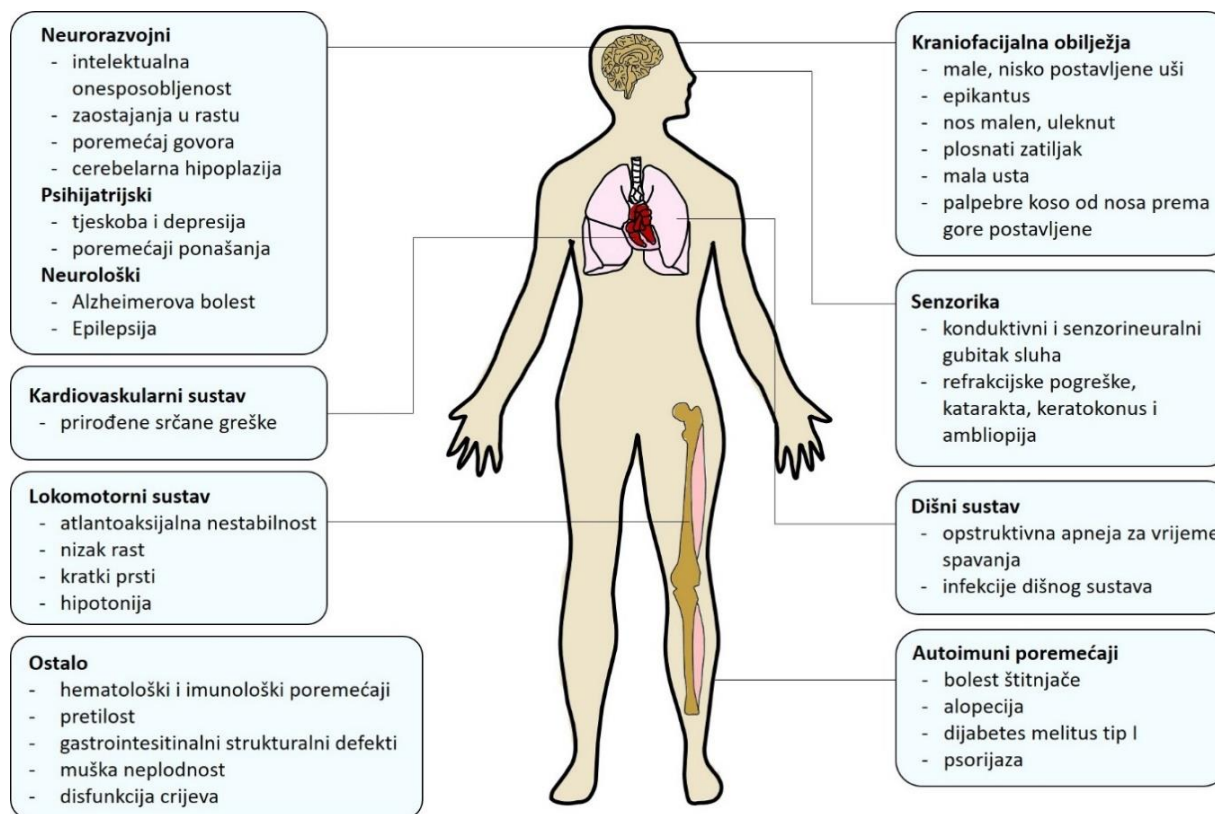
1.1.2. Etiologija

Klinička slika Downova sindroma povezana je s tri različita kariotipa. Regularni tip trisomije 21 prisutan je u približno 90 % slučajeva [33]. Tri kopije kromosoma 21 prisutne su u svim stanicama kao posljedica nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 tijekom gametogeneze, najčešće u oogenezi, posebno tijekom prve mejotičke diobe [34]. Mozaični kariotip prisutan je u 3 – 5 % slučajeva [33], najčešće s dvjema staničnim linijama. Nastaje kao posljedica pogreške u podjeli kromosoma tijekom mitotske diobe zigote [35]. Translokacijski tip prisutan je u 4 % slučajeva, u obiteljskom (25 %) ili *de novo* obliku (75 %) [33]. Najčešći oblik jest translokacija kromosoma 14/21 ili 21/21 [26]. Ostali tipovi trisomije 21 vrlo su rijetki i prisutni su u oko 1 % slučajeva [33].

Uzrok nepravilnog razdvajanja kromosoma još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Starija životna dob majke i promjene u položaju rekombinacije dva su poznata čimbenika rizika [36, 37]. Brojna istraživanja nastoje razjasniti uzroke nerazdvajanja kromosoma i kliničku sliku Downova sindroma, kako genetičkim tako i epigenetičkim modelima. Epidemiološke studije ukazuju na različite okolišne čimbenike rizika, uključujući socioekonomski status [38], izloženost toksičnim tvarima na radnom mjestu [39], pretilost [40], obrazovni status roditelja [41], konzumaciju duhana, oralnih kontraceptiva [42] te nedostatan unos folata tijekom perinatalnog razdoblja [43]. Pojedinačni doprinos svakog od čimbenika rizika teško je izdvojiti. Nedovoljan unos folata i/ili varijante gena u metabolizmu folata i metionina mogu predstavljati čimbenike rizika za rođenje djeteta s DS-om, no do danas su rezultati proturječni i ograničeni malom veličinom uzorka [26, 44, 45]. James i suradnici (1999) prvi su pretpostavili da varijante gena u metabolizmu folata i metionina mijenjaju obrazac metilacije. Hipometilacija DNK u centromernim i pericentromernim regijama povećava rizik od nepravilnog razdvajanja kromosoma 21 [46]. Nastavno na istraživanja Jamesa i suradnika tijekom godina provedena su brojna istraživanja u različitim geografskim područjima i s različitim etničkim skupinama, ali rezultati su do danas kontradiktorni [47, 48, 49, 50].

1.1.3. Klinička slika

Klinička slika Downova sindroma složena je i varijabilna. Pojedina obilježja, kao što su neurorazvojni poremećaji i tipične kraniofacijalne dismorfije, javljaju se u svih osoba, dok se određena stanja i bolesti, poput prirođenih srčanih grešaka (50 %), opstruktivne apneje (54 – 90 %), Alzheimerove demencije (77 %), poremećaja rada štitnjače (> 50 %), epilepsije (8 %) i leukemije (5 – 30 %), pojavljuju samo u nekih pojedinaca s DS-om [26] (Slika 1).

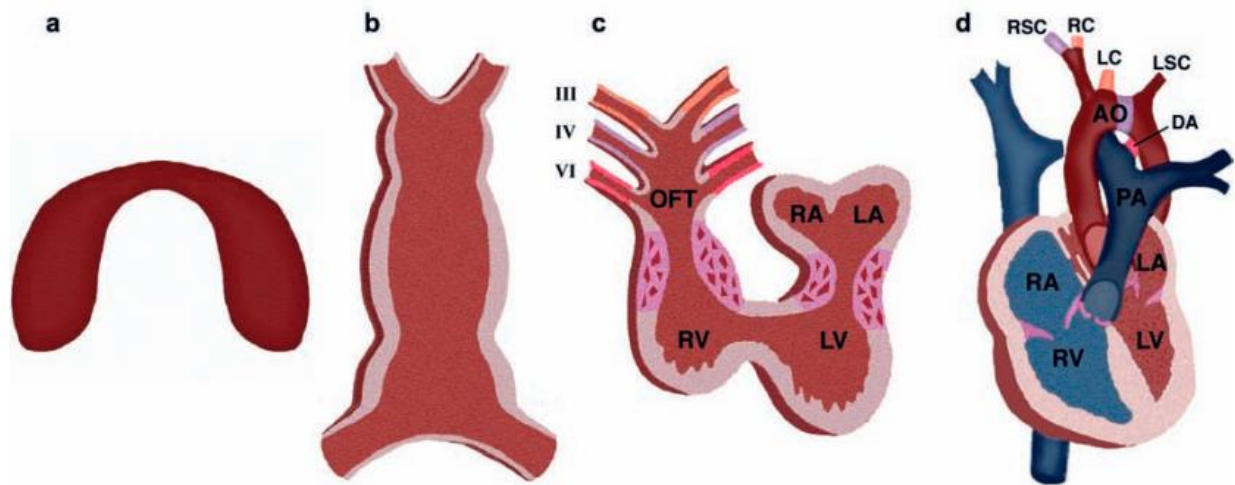


Slika1. Klinička obilježja Downova sindroma (prilagođeno prema [26])

Izvor: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32029743/>

1.2. Prirodene srčane greške

Prirodene srčane greške razvojno su i klinički heterogena skupina strukturalnih i funkcionalnih prirodnih malformacija srca i/ili velikih krvnih žila, koje nastaju uslijed nepotpunog pregrađivanja srca tijekom embrionalnog razdoblja [51]. Razvoj srca počinje početkom trećeg tjedna gestacije. Organogeneza srca složen je i precizno reguliran proces, koji zahtijeva složene stanične interakcije i metaboličke puteve kroz visoko koordinirane faze razvoja [52, 53] (Slika 2).



Slika 2. Faze srčane morfogeneze

Izvor: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568242/>

(a) Srčani polumjesec – 15. dan gestacije – formiranje I kardiogenog područja (b) Linearna srčana cijev – 21. dan gestacije – formiranje II kardiogenog područja, obostrano simetrične primordijalne stanice srca migriraju do središnje linije (c) Srčana petlja – 28. dan gestacije – rast i savijanje srčane cijevi u srčanu petlju, pozicionirajući pretklijetke iznad klijetki (d) Srčane komore – tijekom 6. i 7. tjedna gestacije – razvoj srčane pregrade, razdvaja srce u četiri različite komore i zajednički izlazni trakt, septiran u aortu i plućnu arteriju, rezultira plućnom i sistemskom cirkulacijom; opsežno remodeliranje zalisaka i razvoj klijetki označava zrelo razvijeno srce.

AO – aorta; DA – arterijski duktus (engl. *ductus arteriosus*); LA – lijeva pretklijetka (engl. *left atrium*); LC – lijeva karotidna arterija (engl. *left carotid artery*); LV – lijeva klijetka (engl. *left ventricle*); LSC – lijeva potključna arterija (engl. *left subclavian artery*); OFT – izlazni trakt srca (engl. *outflow tract*); PA – plućna arterija (engl. *pulmonary artery*); RA – desna pretklijetka (engl. *right atrium*); RC – desna karotidna arterija (engl. *right carotid artery*); RSC – desna potključna arterija (engl. *right subclavian artery*); RV – desna klijetka (engl. *right ventricle*).

1.2.1. Epidemiologija

Prirođene srčane greške čine gotovo trećinu svih prirođenih anomalija s prevalencijom od 8/1000 živorođenih [51, 54]. Distribucija PSG-a prema spolu pokazuje da defekti srca koji zahvaćaju izlazni trakt prevladavaju kod muškaraca, dok defekti ulaznog trakta i lezije šanta češće zahvaćaju žene. Dobiveni nalazi se tumače biološkim razlikama između žena i muškaraca koje mogu pridonijeti raznolikosti anatomskih vrsta PSG-a. Rezultati istraživanja ukazuju na statistički značajan porast rizika za razvoj ozbiljnijih vrsta PSG-a kod muškaraca. Ovo može sugerirati da

je jedan od spolova osjetljiviji na određene egzogene ili endogene čimbenike tijekom ključnih ranih faza embrionalnog razvoja [55, 56].

Septalni defekti čine dominantnu vrstu PSG-a, pri čemu ventrikularni septalni defekt (VSD, engl. *ventricular septal defect*), atrijski septalni defekt (ASD, engl. *atrial septal defect*) i otvoreni arterijski duktus (PDA, engl. *patent ductus arteriosus*), poznati kao “blaže lezije”, čine 57,9 % svih slučajeva PSG-a [51]. Globalna prevalencija PSG-a raste za 10 % svakih 5 godina, s pretpostavkom da više od 90 % tog povećanja proizlazi iz poboljšane detekcije “blažih lezija” [57]. Prevalencija PSG-a varira među populacijama i zemljopisnom podrijetlu, s najnižom u Africi 2,3/1000 i najvišom u Aziji 9,3/1000 [51]. Heterogenost prevalencije može se objasniti socioekonomskim statusom, dostupnošću zdravstvene zaštite te utjecajem različitih genetičkih ili okolišnih čimbenika.

Prirođene srčane greške predstavljaju vodeći uzrok smrti od nezaraznih bolesti među osobama mlađim od 20 godina, sa stopom smrtnosti od 19,8 % [58]. Stopa smrtnosti značajno varira širom svijeta, prvenstveno zbog neravnoteže u ekonomiji i zdravstvenoj zaštiti. Utvrđeno je da je stopa smrtnosti u regijama s niskim socioekonomskim indeksom (engl. *Socio-Demographic Index, SDI*) približno pet puta veća (4,9/100 000) u usporedbi s regijama visokog SDI-a (1,2/100 000). Nadalje, dobno standardizirana stopa smrtnosti (engl. *Age-Standardized Mortality Rate, ASMR*) viša je među muškarcima, pri čemu se preko 80 % smrtnih slučajeva bilježi kod djece mlađe od 5 godina [59].

Većina PSG-a pojavljuju se kao izolirane malformacije, dok je 25 – 30 % udruženo s drugim anomalijama [60]. Primarne malformacije nastaju tijekom rane faze kardiovaskularne morfogeneze, dok deformacije nastaju nakon završetka morfogeneze i posljedica su utjecaja okolišnih čimbenika tijekom intrauterinog razvoja. S druge strane, disrupcije se postupno manifestiraju tijekom rasta jedinke [61].

1.2.2. Etiologija

Etiologija u većini slučajeva ostaje nepoznata. Kromosomske promjene uzrokuju 10 – 12 % PSG-a u živorođene djece [62, 63], promjene u samoj sekvenci gena prisutne su u 10 % PSG-a [64], a oko 2 % nastaje djelovanjem okolišnih čimbenika [65]. Prepoznati su različiti egzogeni i endogeni čimbenici rizika koji doprinose razvoju PSG-a u potomaka. Među egzogenim čimbenicima su različiti teratogeni poput lijekova, alkohola, hipoksije, nutritivnih nedostataka, pušenja, onečišćenja zraka, učinci sezonalnosti i hiperhomocisteinemije [66, 67, 68, 69, 70]. Rizik za razvoj PSG-a nakon izloženosti teratogenima ovisi o dozi, razdoblju i trajanju izloženosti [26].

Među endogene čimbenike rizika ubrajaju se različite bolesti i stanja majke, kao što su dijabetes melitus, pretilost, fenilketonurija, virusne infekcije, hipertermija, te dob i reproduktivna povijest majke [4, 66, 71].

Prema anatomskim i hemodinamskim promjenama, PSG se klinički klasificiraju u različite podvrste ovisno o stupnju složenosti [72]. Modificirana Clarkova klasifikacija PSG-a (1993) pretpostavlja da je složenost i heterogenost PSG-a rezultat multifaktorijalne etiologije, koja obuhvaća interakciju embrioloških, genetičkih i okolišnih čimbenika [73, 74, 61] (Tablica 1).

Tablica 1. Modificirana Clarkova klasifikacija prirođenih srčanih grešaka

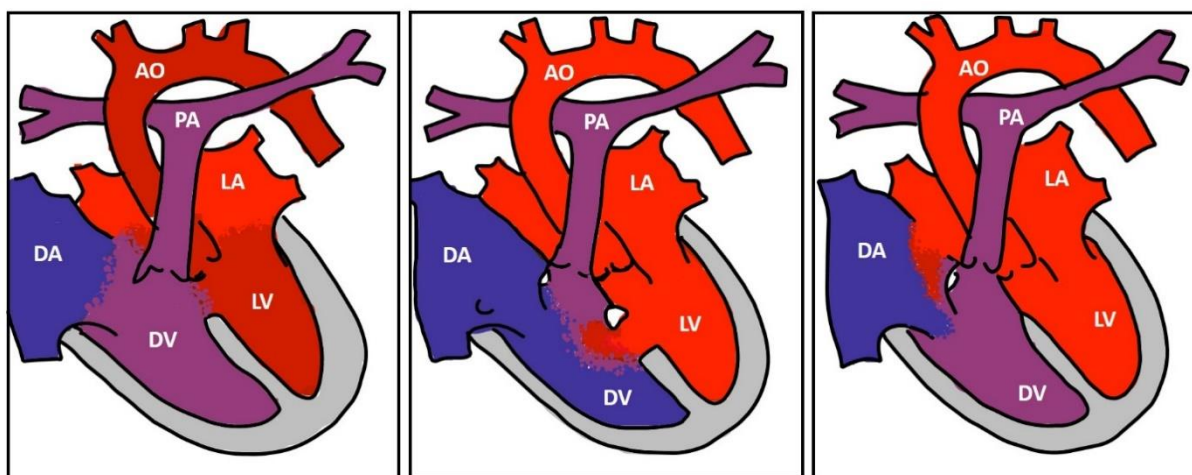
Patogenetički razvojni mehanizmi	Morfološki defekti
I. Defekti smještaja i stvaranja srčane petlje	Heterotaxia Situs viscerum inversus totalis Korigirana transpozicija velikih krvnih žila (I-TGA) Superior-inferior ventrikul
II. Migracijske anomalije ektomenzehimalnoga tkiva - defekti pregrađivanja konotrunkusa - abnormalni položaj konotrunkalnih jastučića - arterija faringealnog škržnog luka	Poremećen aortomitralni kontinuitet (asimptomatski tip) Ventrikularni septalni defekt tip II – subarterijalni Desni ventrikul s dvostrukim izgonskim dijelom Fallotova tetralogija Pulmonalna atrezija s ventrikularnim septalnim defektom Aortopulmonalni prozor Truncus arteriosus communis Kompletna transpozicija velikih krvnih žila - s intaktnim s ventrikularnim septalnim defektom - s ventrikularnim septalnim defektom, pulmonalnom stenozom ili trikuspidnom atrezijom Prekinuti luk aorte tip B Dvostruki aortni luk Desni luk aorte
III. Defekti ekstracelularnog matriksa - defekti endokardijalnih jastučića - displazija pulmonalne/aortne valvule	Atrijski septalni defekt tipa I (Ostium primum) Ventrikularni septalni defekt tipa III (inlet) Kompletni atrioventrikularni kanal (CAVC) Displastični pulmonalni/aortni zalisak
IV. Defekti usmjerenog rasta - anomalija utoka plućnih vena	Potpuna anomalija utoka plućnih vena Parcijalna anomalija utoka plućnih vena
V. Abnormalnosti apoptoze	Ventrikularni septalni defekt (mišićni dio) Ebsteinova anomalija trikuspidne valvule
VI. Defekti intrakardijalnoga protoka krvi - defekti protoka u desnom srcu - defekti protoka u lijevom srcu - septalni defekti - perzistirajući duktus arteriosus	Pulmonalna atrezija s intaktnim interventrikularnim septum Pulmonalna stenozna s intaktnim interventrikularnim septum Pulmonalna stenozna s ventrikularnim septalnim defektom Periferna pulmonalna stenozna Bikuspidna pulmonalna valvula Sindrom hipoplastičnoga lijevog srca Stenoze srčanih zalisaka (aortne, mitralne) Koarktacija aorte Prekid aortalnog luka tipa A Ventrikularni septalni defekt perimembranozni Atrijski septalni defekt tipa I (Ostium secundum) perzistirajući duktus arteriosus Botalli

*prilagođeno prema [61]

1.3. Prirođene srčane greške u Downovu sindromu

1.3.1. Epidemiologija i etiologija

Povezanost između Downovog sindroma i prirodnih srčanih grešaka prvi put je dokumentirana od strane Garroda [75]. Prema istraživanjima, prevalencija PSG-a kod osoba s DS-om varira između 40 % i 77 % [2, 4, 5, 6, 76, 77, 78]. Najčešće vrste PSG-a u ovim slučajevima uključuju atrioventrikularni septalni defekt (engl. *atrioventricular septal defect*; AVSD, 51 %), VSD (25 %) i ASD (9 %) [79, 80, 81] (Slika 3).



Slika 3. Najčešće vrste prirodnih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom

AO – aorta; PA – plućna arterija; DA – desna atrij; LA – lijeva atrij; DV – desni ventrikl; LV – lijevi ventrikl

Atrioventrikularni septalni defekt prisutan je u 2,8 % slučajeva koji nisu povezani s Downovim sindromom, u usporedbi sa 60,1 % slučajeva s DS-om [82]. Ova značajna razlika u prevalenciji sugerira mogućnost da varijacija odražava svojstvene karakteristike proučavane populacije, uključujući potencijalno veću učestalost varijanti gena koje predisponiraju prisutnost AVSD-a [83]. Važno je napomenuti da prevalencija različitih vrsta PSG-a može značajno varirati među istraživanjima, što je posljedica primjene različitih dijagnostički metoda, varijabilnosti veličine uzorka, klasifikacijskih razlika te varijacija uključivanja prolaznih ili fizioloških PSG-a [29, 84, 85, 86]. Složene PSG su rjeđe zastupljene u dojenčadi s DS-om nego u dojenčadi bez DS-a, što može biti rezultat više čimbenika. Jedan od mogućih razloga može biti selektivni pobačaj fetusa s DS-om. Također, poboljšanja u antenatalnoj dijagnostici složenih PSG-a mogu doprinijeti boljem prepoznavanju tih grešaka tijekom trudnoće, što može rezultirati smanjenom učestalošću njihove pojave u novorođenčadi s DS-om zbog prekida trudnoće [87].

Distribucija PSG-a prema spolu i etničkim razlikama uvjetovana je vrstom srčane greške [88].

Nedavna epidemiološka studija provedena od strane Uludağ Alkaya i suradnika (2023) u razdoblju od 1986. do 2022. godine pratila je 1731 osobu s DS-om. Ventrikularni septalni defekt i ASD identificirani su kao najčešće vrste PSG-a među svim citogenetskim tipovima DS-a. U skupini osoba s DS-om i prisutnom PSG-om, kardiokirurška intervencija provedena je u 34,4 % slučajeva, s prosječnom dobi intervencije od 7 mjeseci. Razlozi za intervenciju najčešće su bili povezani s Fallotovom tetralogijom (TOF, engl. *Tetralogy of Fallot*) (77,8 %), AVSD-om (61,6 %) i VSD-om (39 %). Kardiovaskularne komplikacije istaknute su kao vodeći uzrok smrti u bolesnika s PSG-om, čineći 47,2 % smrtnih slučajeva u toj skupini. Petogodišnje preživljenje pokazalo se značajno različitim među skupinama pacijenata s DS-om, ovisno o prisutnosti i težini PSG-e. Bolesnici bez PSG-e imali su izuzetno visoko petogodišnje preživljenje od 97,4 %. Kod onih s lakšom PSG-om stopa preživljenja iznosila je 95,6 %, dok je kod onih s umjerenom do teškom PSG-om bila nešto niža, ali i dalje značajna, s 86,1 % [5].

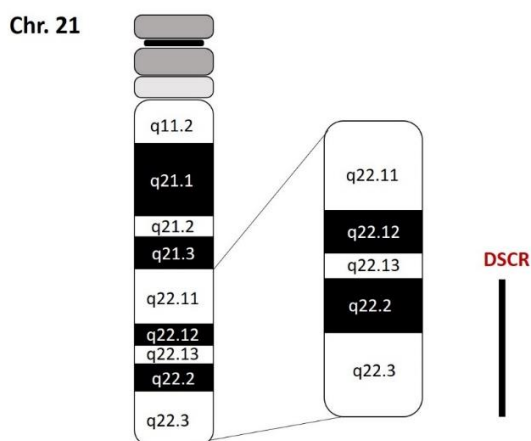
Uzrok prirođenih srčanih grešaka kod osoba s DS-om do danas nije razjašnjen. Budući da više od 50 % osoba s DS-om ima normalno građeno srce, PSG se ne mogu smatrati isključivo posljedicom trisomije 21 [8], za razvoj PSG-a potrebno je međudjelovanje različitih genetskih i epigenetskih čimbenika rizika [89].

Epidemiološke studije su identificirale niz čimbenika rizika povezanih s razvojem PSG-a kod osoba s DS-om. Spol djeteta jedan je od identificiranih čimbenika rizika, kako su istražili Uludağ (2023), Haider (2023), Mughal (2020), Diogenes (2017), Somasundaram (2018), Corona-Rivera (2019), Takano (2019), Santoro (2018) i Rehman (2022) Ostali čimbenici rizika obuhvaćaju porođajnu težinu prema istraživanjima Kim (2014) i El-Gilany (2017), dob roditelja prema Somasundaram (2018), Asim (2022), Kim (2014) i Chéhab (2007), krvno srodstvo roditelja prema Somasundaram (2018) i El-Gilany (2017), obrazovanje roditelja prema istraživanju Corona-Rivera (2019), spontani pobačaj u prethodnim trudnoćama prema Asim (2022), paritet prema El-Gilany (2017) i Somasundaram (2018), indeks tjelesne mase prema istraživanju Corona-Rivera (2019), El-Gilany (2017) i Bergström (2016), izloženost akutnoj/kroničnoj bolesti tijekom trudnoće prema El-Gilany (2017), te korištenje duhana, antibiotika i oralnih kontraceptiva prema El-Gilany (2017), Bergström (2016) i Mokhtar (2001) [5, 29, 77, 83, 84, 86, 90, 91, 92, 82, 93, 4, 94, 87, 95]. Dodatno, suplementacija folne kiseline je također identificirana kao čimbenik rizika prema Asim (2022), Corona-Rivera (2019), El-Gilany (2017) i Bean (2011) [4, 86, 93, 96] (Prilog 1. tablica 2).

Suplementacija folne kiseline, bilo samostalno ili u kombinaciji s vitaminima i mineralima tijekom perikonceptijskog razdoblja, igra ključnu ulogu u prevenciji defekta neuralne cijevi (engl. *neural tube defect, NTD*) [97]. Vjerojatno objašnjenje povezanosti neadekvatnog unosa folne kiseline i PSG-a može se pronaći u visokoj koncentraciji homocisteina [98]. Uz to, pozitivna korelacija između razine majčinog serumskog homocisteina i učestalosti PSG-a dodatno potvrđuje ovu povezanost [99, 100]. Unatoč provedenim studijama, još uvijek nije potpuno razjašnjena učinkovitost folne kiseline, bilo samostalno ili u kombinaciji, u prevenciji PSG-a. Soheilard (2020) naglašava da za dobivanje preciznijih rezultata nužno treba provesti opsežne i dobro osmišljene studije koje će uključivati dobro definirane PSG, odabrane doze folne kiseline te rano početno propisivanje u homogenim populacijama prvorotkinja bez povijesti pobačaja i mrtvorodenosti [101].

1.3.2. Genetički čimbenici rizika

Dvije hipoteze nastoje objasniti i razumjeti veze između PSG-a i DS-a. Prema hipotezi genske doze (engl. *gene dosage amplification hypothesis*), pretpostavlja se da je zbog trisomije kromosoma 21 povećana i ekspresija gena za 1,5 puta [102, 103]. Ovaj model uspostavlja koncept kritične regije za PSG kod DS-a (engl. *DS-CHD critical region*) s određenim genima (*DSCAM* (engl. *DS cell adhesion molecule*); *COL6A1* (engl. *collagen type VI alpha 1 chain*); *COL6A2* (engl. *collagen type VI alpha 2 chain*); *KCNJ6* (engl. *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 6*; *RCAN1* (engl. *regulator of calcineurin 1*)) koji sudjeluju u kardiogenezi, a promjene u njihovoj ekspresiji povezuju se s povećanim rizikom za razvoj PSG-a kod osoba s DS-om [104] (Slika 4).



Slika 4. Kritična regija za prirodene srčane greške u Downovu sindromu

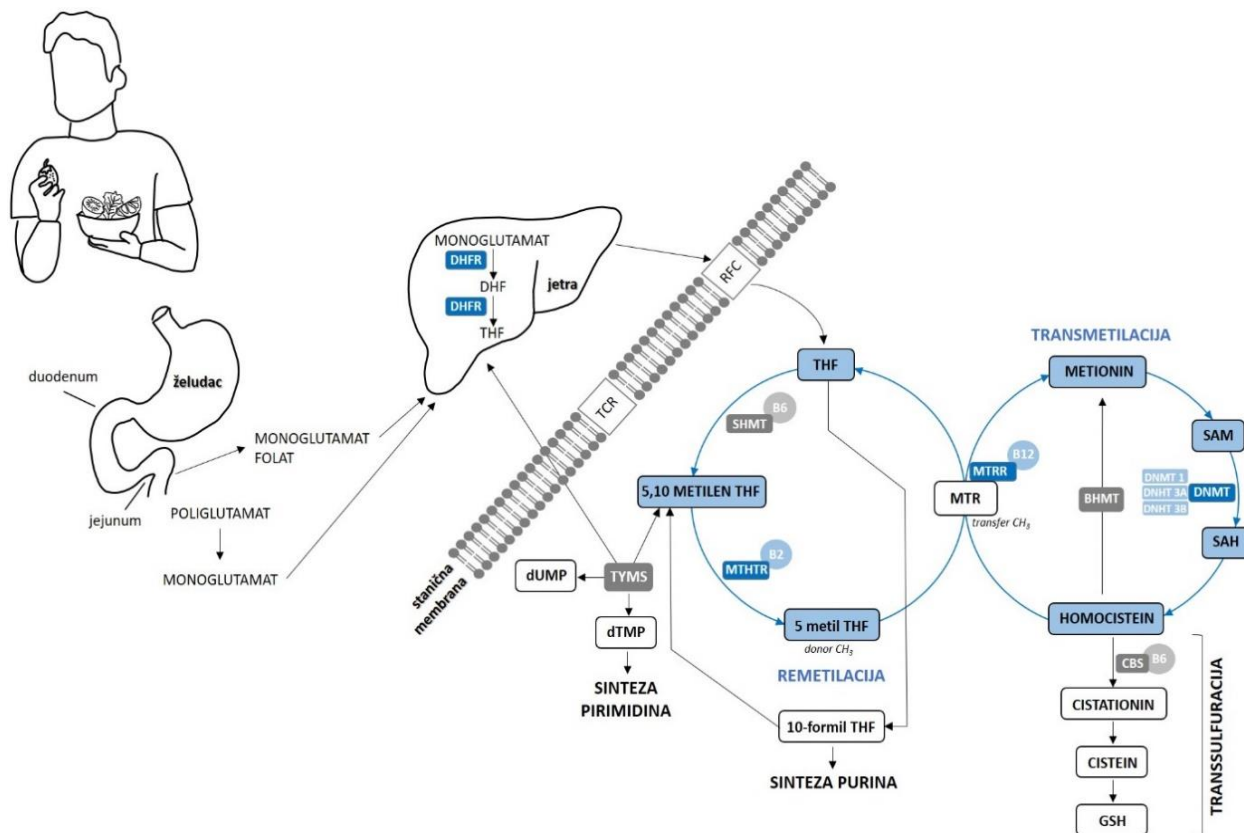
Chr. 21 – kromosom 21 (engl. *chromosome 21*); DSCR – Down sindrom kritična regija (engl. *Down syndrome critical region*)

S obzirom na to da PSG nisu isključivo posljedica trisomije 21, druga hipoteza temelji se na konceptu hipoteze mutacije gena (engl. *gene mutation hypothesis*). Prema toj hipotezi, prekomjerna ekspresija gena na kromosomu 21 djeluje u kombinaciji sa specifičnim mutacijama ili polimorfizmima jednog nukleotida [8, 105]. Nadalje, za razvoj PSG-a odgovorni su mnogobroji geni na drugim kromosomima, male molekule ribonukleinske kiseline (mikroRNK, engl. *MicroRNA*, miRNA), varijante broja kopija (engl. *copy number variations*, CNV), negenetički faktori, signalni putevi, polimorfizmi jednog nukleotida i promjene u metabolizmu folata i metionina [89, 106].

1.3.2.1. Metabolizam folata i metionina

Metabolizam folata i metionina predstavlja dva međusobno povezana ciklusa u kojima se sintetiziraju i prenose metilne skupine nužne za različite reakcije metilacije unutar stanice [18]. Folat, esencijalni vitamin B9, ključan je za normalan rast i diobu stanica, sintezu nukleinskih kiselina, aminokiselina te S-adenozilmetionina (SAM, engl. *S-adenosylmethionine*), donora metilne skupine za reakcije metilacije u stanici [45]. Nedostatak folata može rezultirati lomom lanca DNK, hipometilacijom DNK, aberantnom ekspresijom gena i segregacijom kromosoma [107]. Prirodni izvori folata uključuju zeleno lisnato povrće, mahunarke, jetru, žitarice, kivi, jagode i citrusno voće, dok je folna kiselina, sintetski pripravak B vitamina i dodatak prehrani, poznata po većoj stabilnosti i bioraspoloživosti u usporedbi s folatima [108]. Folat, nakon apsorpcije u duodenumu i gornjem dijelu jejunuma, prenosi se izravno u jetru u obliku monoglutamata ili, putem pteroil poliglutamata hidrolaze, konvertira se iz poliglutamata u monoglutamat i tada se transportira u jetru. Dihydrofolat reduktaza (DHFR, engl. *dihydrofolate reductase*) u jetri katalizira redukciju monoglutamata u dihydrofolat (DHF, engl. *dihydrofolate*) te dihydrofolat u tetrahydrofolat (THF, engl. *tetrahydrofolate*), najzastupljeniji oblik folata u plazmi. Hidrofilna molekula folata prenosi se putem transportnih proteina poznatih kao folatni nosači u stanicu (RFC1, engl. *reduced folate carrier*). Unutar stanice, THF se pomoću enzima serin hidroksimetiltransferaze (SHMT, engl. *serine hydroxymethyltransferase*) uz kofaktor vitamin B6 (piridoksin) konvertira u 5,10-metilentetrahydrofolat (5,10-metilenTHF, engl. *5,10-methylenetetrahydrofolate*). Ključni enzim u metabolizmu folata N5,N10-metilentetrahydrofolat-reduktaza (MTHFR, engl. *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*), kodiran istoimenim genom metilentetrahydrofolat reduktaza (engl. *methylenetetrahydrofolate reductase*, *MTHFR*) smještenim na kromosomu 1p36.3, uz kofaktor vitamin B2 (riboflavin) igra ključnu ulogu u ireverzibilnoj konverziji 5,10-metilenTHF u N5-metiltetrahydrofolat (5-metilTHF, engl. *5-methyltetrahydrofolate*), glavnu

cirkulirajuću formu folata i donora metilnih skupina. Sljedeći ključni regulatorni enzim, N5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza (MTRR, engl. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase*), kodiran genom 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza (engl. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase, MTRR*), na kromosomu 5p15.31, katalizira konverziju inaktivnog oblika enzima metionin-sintetaze (MTR, engl. *methionine synthase*) u aktivni oblik, pri čemu vitamin B12 (cijanokobalamin) djeluje kao ključni kofaktor za prijenos metilne skupine. Enzim metionin-sintetaza katalizira reakciju remetilacije homocisteina, stvarajući THF i metionin. Homocistein, aminokiselina koja nije uključena u sintezu proteina, djeluje kao posrednik u metabolizmu metionina. Metionin, esencijalna aminokiselina, putem metionin adenziltransferaze djeluje kao supstrat za SAM, kofaktor i donor metilne skupine za reakcije metilacije uključujući metilaciju DNK, RNK, neurotransmitera, lipida i proteina poput histona. Metilne skupine djeluju kao ključni supstrat za metilaciju DNK, čineći osnovni epigenetički mehanizam putem kojeg okolišni čimbenici moduliraju ekspresiju gena, bez obzira na nukleotidni slijed DNK. Ovaj ključni epigenetički mehanizam uključen je u regulaciju brojnih staničnih mehanizama tijekom normalnog razvoja organizma, ali također igra značajnu ulogu u patološkim procesima. Kada je DNK konačni akceptor metilne skupine, reakciju kataliziraju izvršni enzimi u procesu metilacije DNK, metiltransferaze DNK (DNMT, engl. *DNA methyltransferases*). Razlikujemo nekoliko DNK metiltransferaza koje sudjeluju u prijenosu metilnih skupina na peti ugljikov atom nukleotida citozina s donora S-adenozil-L-metionina: DNMT1 (engl. *DNA methyltransferase 1*), DNMT2 (engl. *DNA methyltransferase 2*), DNMT3 alfa (DNMT3A, engl. *DNA methyltransferase 3 alpha*), DNMT 3 beta (DNMT3B, engl. *DNA methyltransferase 3 beta*). DNMT1, kodirana istoimenim genom na kromosomu 19p13.2, igra ključnu ulogu u održavanju obrasca metilacije tijekom diobe stanice, dok su geni za metiltransferaze *DNMT3A* i *DNMT3B*, smješteni na kromosomu 2p23.3 odnosno na kromosomu 20q11.21 i imaju ključnu ulogu u uspostavljanju *de novo* obrasca metilacije tijekom rane embriogeneze. S-adenozilmetionin putem procesa transmetilacije transformira se u S-adenozilhomocistein (SAH, engl. *S-adenosyl homocysteine*), kompetitivni inhibitor brojnih metiltransferaza. Ukoliko S-adenozilhomocistein ne prođe proces remetilacije u metionin, slijedi ulazak u put transulfuracije gdje se nepovratno pretvara u cistein (Slika 5) [45, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115].



Slika 5. Metabolizam folata i metionina

Enzimi: BHMT, betain-homocistein metiltransferaza; CBS, cistationin beta-sintaza; DHFR, dihidrofolat reduktaza; DNMT, DNK metiltransferaze; MTHFR, metilen tetrahidrofolat reduktaza; MTR, metionin sintaza; MTRR, metionin sintaza reduktaza; RFC1, nosač reduciranih folata 1; SHMT, serin hidroksimetiltransferaza; TCR, tanskobalamin receptor; TYMS, timidilat sintaza; Metaboliti: DHF, dihidrofolat; GSH, glutation; THF, tetrahidrofolat; dTMP deoksitimidinmonofosfat; dUMP, deoksiuridin monofosfat; SAH, S-adenosil homocistein; SAM, S-adenosilmetionin; Kofaktori: B2, vitamini B2; B6, vitamin B6; B12, vitamin B12;

CH₃: metilna skupina; 5,10-metilenTHF, 5-metilTHF

1.3.2.1.1. Varijante gena metabolizma folata i metionina

Varijanta jednog nukleotida (engl. *single nucleotide variant, SNV*) ili polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*), prisutna je u više od 1 % populacije [116] i može djelovati kao rizični ili protektivni čimbenik za različita stanja ili bolesti. Takve varijante mogu utjecati na aktivnost promotora, regulaciju ekspresije gena, mjesta spajanja i vezanja transkripcijskih faktora, kao i na epigenetske modifikacije [117, 118]. To rezultira direktnim ili indirektnim utjecajem na sveukupnu genetsku pozadinu pojedinca, obitelji ili populacije, što može

interferirati s različitim čimbenicima okoliša [119]. Tijekom proteklih godina, provedena su brojna istraživanja usmjerena na analizu povezanosti između varijanti gena, odgovornih za kodiranje enzima uključenih u metabolizam folata i metionina, te pojave PSG-a (Prilog 2. tablica 3, 4; Prilog 3. tablica 5). Pretpostavka je da analizirani utjecaji varijanti gena pojedinačno i/ili u kombinaciji rezultiraju povećanjem razine homocisteina, što dovodi do promjena u obrascu metilacije DNK u ranoj embrionalnoj fazi, direktno utječući na ekspresiju ključnih gena za kardiogenezu. Istraživanja na animalnim modelima sugeriraju povezanost PSG-a s niskim vrijednostima folata odnosno visokim vrijednostima homocisteina, što posljedično može rezultirati abnormalnom diferencijacijom, migracijom i apoptozom u stanicama neuralnog grebena koje primarno utječu na interventrikularni septum i konotrunkalnu regiju srca [120, 121, 122].

1.3.2.1.2. Varijante gena metilentetrahidrofolat-reduktaze

Dva najčešća polimorfizma gena *MTHFR*, *MTHFR* 677C>T i 1298A>C [123], prepoznata su kao čimbenici rizika za različita stanja i bolesti kod ljudi, kao što su muška neplodnost, pobačaji, defekti neuralne cijevi, Downov sindrom, prirođene srčane greške, autoimuni poremećaji, te zloćudne, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti [124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131]. Najvažniji funkcionalni polimorfizam gena *MTHFR* 677C>T, lociran je u katalitičkoj domeni proteina. Mutacije unutar te domene mogu igrati ulogu u vezanju supstrata [132]. Ovaj polimorfizam, dbSNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism database*) rs1801133 [133] proizlazi iz supstitucije baze citozina u timin u 4. egzonu, rezultirajući zamjenom aminokiseline alanina u valin (Ala222Val) i smanjenjem aktivnosti enzima. Enzim djeluje kao protein dimer, stabiliziran fiziološkim razinama folata, no polimorfizam dovodi do stvaranja termolabilne varijante enzima *MTHFR* s umanjenom enzimskom aktivnošću. Enzimska aktivnost homozigota rs1801133 TT iznosi 30 %, a heterozigota CT 65 % u odnosu na divlji genotip [112]. To uzrokuje stvaranje smanjenje količine aktivnog oblika folate, 5-metil-THF i neadekvatnu remetilaciju homocisteina, što rezultira pojavom hiperhomocisteinemije [134]. Hiperhomocisteinemija rezultira povećanim oksidativnim stresom, što dovodi do poremećaja endotelne funkcije i posljedično razvojem kardiovaskularnih bolesti [135]. Podaci meta-analize ukazuju na globalnu prevalenciju alela T i genotipa TT od 24,0 % odnosno 7,7 %. Kada je riječ o podskupinama, najniža učestalost alela T i genotipa TT od 24,0 % odnosno 7,7 %. Kada je riječ o podskupinama, najniža učestalost alela T i genotipa TT zabilježena je među populacijom Afrike (10,3 %), dok je najviša među Europljanima (34,1 %). Ovi rezultati sugeriraju da je učestalost alela T i genotipa TT C677T najveća u bijeloj populaciji [136].

Do danas je polimorfizam *MTHFR* rs1801133 istraživani u brojnim studijama kao potencijalni čimbenik rizika za razvoj PSG-a, što je dalo proturječne rezultate (Prilog 2. tablica 3, 4; Prilog 3. tablica 5). Godine 2001. Junker i suradnici prvi su puta proveli istraživanje o

povezanosti polimorfizma *MTHFR* rs1801133 i PSG-a na uzorku 114 ispitanika bijele populacije mlađih od 16 godina, s nesindromskim PSG-ma. Njihovi rezultati sugeriraju da *MTHFR* rs1801133 homozigotni TT genotip predstavlja čimbenik rizika ($p = 0,027$) za razvoj strukturnih PSG-a tijekom rane trudnoće u njemačkoj populaciji [137]. Iste godine, Wenstrom i suradnici proveli su istraživanje o povezanosti polimorfizma *MTHFR* rs1801133 i razine homocisteina s PSG-ma na uzorcima amniocita plodove vode. Rezultati studije su pokazali da je 50 % fetusa s PSG-om imalo ili visoku razinu homocisteina ili polimorfizam *MTHFR* rs1801133 ($p = 0,003$), dok je 12 % ispitanika imalo oboje ($p = 0,0006$) [138].

Nakon početnih istraživanja usmjerenih na razjašnjavanje uloge varijanti gena metabolizma folata i metionina u etiologiji nesindromskih PSG-a, većina kasnijih studija ističe mogući doprinos varijante *MTHFR* rs1801133 kao čimbenika rizika za razvoj PSG-a [139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147]. Međutim, često su rezultati studija proturječni.

Prva meta-analiza provedena 2007. godine, koja je uključila analizu trinaest studija, ukazala je da ne postoji povezanost između polimorfizma *MTHFR* rs1801133 CT i TT genotipa s PSG-om [148], isti rezultati dobiveni su i u sljedeće dvije meta-analize na jedanaest [149] i na dvadeset dvije studije [16]. Međutim, kasnije meta-analize, provedene posljednjih godina nakon sve većeg broja dostupnih znanstvenih istraživanja, potvrdile su povezanost polimorfizma *MTHFR* rs1801133 i razvoja PSG-a [12, 15, 112, 126, 150, 151, 152, 153, 154, 155].

Naknadna stratifikacija podataka prema etničkim skupinama otkrila je statistički značajnu povezanost između *MTHFR* rs1801133 i PSG-a u azijskoj populaciji [15,150]. S druge strane, rezultati Wang i suradnika ukazuju da je alelni model statistički značajno povezan s rizikom od nesindromskih PSG-a u azijskoj i europskoj populaciji [112].

Povezanost varijanti gena ciklusa folata i metionina s razvojem PSG-a kod osoba s DS-om rijetko je istraživana, pri čemu postoji tek nekoliko objavljenih radova s nedosljednim rezultatima (Prilog 3. tablica 5).

Ganguly i suradnici (2021) genotipizirali su četiri skupine ispitanika u indijskoj populaciji: DS s AVSD-om (DS-AVSD, $N = 479$), DS bez AVSD-a (DS, $N = 540$), osobe bez DS-a s AVSD-om (kontrola AVSD, $N = 321$) i osobe bez DS-a i bez AVSD-a (kontrola, $N = 409$), s ciljem istraživanja sinergijske povezanosti polimorfizama *MTHFR* C677T i *RFC1* A80G s učestalošću AVSD-a kod osoba s DS-om. Značajno veća učestalost alela "T" varijante *MTHFR* C677T detektirana je u DS-AVSD skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom, s $OR = 1,75$. Također, zabilježena je značajno viša učestalost u kontrolnoj AVSD skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, te DS-AVSD skupini u usporedbi s kontrolnom AVSD skupinom, s $OR = 1,32$. *MTHFR* rs1801133 CT i TT genotip pokazali su značajno veću učestalost u DS-AVSD skupini u usporedbi s

kontrolnom skupinom. Također, utvrđen je povećan rizik za razvoj PSG-a u prisutnosti oba ispitivana polimorfizma. S obzirom na značajnu ulogu gena *MTHFR* i *RFC1* u metabolizmu folata i metionina, koji reguliraju globalnu DNK metilaciju gena ključnih za razvoj embrionalnog srčanog septuma, varijacije ovih gena vjerojatno sprječavaju staničnu proliferaciju. Ovaj učinak vjerojatno se pojačava u prisutnosti trisomije 21 [156].

Elsayed i suradnici (2014) proveli su studiju u skupini majki djece sa septalnim defektima, od kojih je 26 imalo DS, a 35 nije, te u kontrolnoj skupini majki zdrave djece. Učestalost *MTHFR* rs1801133 CT genotipa bila je značajno veća u majki djece s DS-om i atrioventrikularnim kanalom. Također, učestalost TT genotipa bila je značajna kod majki djece s DS-om i ASD-om [157].

Međutim, istraživanja provedena u tri različita geografska područja nisu pronašla povezanost između *MTHFR* rs1801133 i PSG-a kod osoba s Downovim sindromom [158, 159, 160]. Unatoč tome, postoji određeni broj potvrđenih meta-analiza koje su uključile istraživanja nesindromskih i sindromskih PSG-a [140, 150, 151, 161] (Prilog 2. tablica 4).

Drugi značajan polimorfizam gena *MTHFR*, *MTHFR* 1298A>C, proizlazi iz supstitucije baze adenina u citozin u 7. egzonu, dbSNP rs1801131 [133], rezultirajući zamjenom glutaminske aminokiseline u alanin (Glu429Ala), na kodonu 429 u C-terminalnoj regulacijskoj domeni proteina. Heterozigotni nosioci AC pokazuju smanjenje enzimske aktivnosti od 15 %, dok homozigotni nosioci CC pokazuju smanjenje od 30 % [162]. Učestalost alela *MTHFR* 1298C je viša u azijskoj populaciji (36,0 – 40,0 %) u odnosu na bijelu populaciju (33,0 – 35,0 %) [163].

Istraživanja polimorfizma *MTHFR* rs1801131 uglavnom su usmjerena na sinergijsko djelovanje s polimorfizmom rs1801133, stoga je posebnost meta-analize Yu i suradnika (2017) u tome što je to jedina metaanaliza do danas koja se pojedinačno bavila povezanošću rs1801131 i PSG-a. U istraživanje je uključeno šesnaest studija sindromskih i nesindromskih PSG-a objavljenih prije 2014. godine, 2207 slučajeva i 2364 kontrole. Rezultati ukazuju da genotip CC ima veću osjetljivost za PSG za 38 % u usporedbi s AA + AC u cjelokupnoj populaciji. Analiza podskupina otkrila je da su te povezanosti prisutne kod ispitanika bez DS-a u genetičkim modelima za CC u odnosu na AA, CC u odnosu na AC, te u recesivnom modelu AA + AC [151].

Ranije provedna meta-analiza pokazala je statistički značajnu povezanost rs1801131 i PSG-a u pedijatrijskoj populaciji (CC prema AC: $p = 0,034$; recesivni model $p = 0,038$), te je pronađena značajna asocijacija kod djece bijele populacije (CC prema AC: $p = 0,032$) [153]. Nadalje, ispitanici koji nose C alel u *MTHFR* rs1801131 imaju 2,05 – 2,20 puta veći rizik za konotrunkalne srčane defekte (KSD, *engl. conotruncal heart defects* – CTDs) (AC prema AA; $p = 0,0023$; CC prema AA: $p = 0,0011$) [164].

Rezultati povezanosti *MTHFR* rs1801131 i PSG-a kod osoba s DS-om nisu jednoznačni. Istraživanja provedena u različitim zemljopisnim područjima, nisu utvrdila povezanost rs1801131 i PSG-a kod osoba a s DS-om [47, 158, 159, 160]. Locke i suradnici (2010) utvrdili su češće nasljeđivanje A alela *MTHFR* rs1801131 u DS osoba s AVSD-om [165].

Hobbs i suradnici (2006) utvrdili su protektivni učinak rs1801131 za nesindromske PSG u američkoj populaciji, pri čemu se alel 1298C prenosio rjeđe nego što je očekivano ($p = 0,0013$). Alternativna objašnjenja za protektivni učinak uključuju: (i) neravnotežu polimorfizma rs1801131 s drugim, još neotkrivenim funkcionalnim polimorfizmom u genu *MTHFR*, (ii) sintezu DNK bez grešaka uzrokovanu nižom fetalnom aktivnošću enzima *MTHFR*, posebno tijekom kardiogeneze kada je brza i precizna sinteza DNK ključna, te (iii) selektivno preživljavanje alela 1298A [166]. Nadalje, Goldmuntz i suradnici otkrili su da ispitanici s varijantom rs1801131, AC i CC genotipa, imaju smanjen rizik u odnosu na ispitanike s AA genotipom [167].

1.3.2.1.3. Varijante gena 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza

Najčešći polimorfizam gena *MTRR*, *MTRR* 66A>G, dovodi do supstitucije isoleucina u metionin (Ile22Met), dbSNP rs1801394 [133], što rezultira smanjenom aktivnosti enzima za remetilaciju homocisteina u metionin [168]. Nalazi se u flavin mononukleotidnoj veznoj domeni enzima *MTRR*, koji je u interakciji s MTR, i na taj način remeti veznu domenu MTR-kobalamin-kompleksa te smanjuje aktivnost enzima i brzinu remetilacije homocisteina [169].

Gaughan i suradnici su utvrdili da rs1801394 AA genotip doprinosi umjerenom povećanju razine homocisteina te povećanju rizika od kardiovaskularnih bolesti u usporedbi s GG homozigotima [170].

Učestalost alela *MTRR* A66G varira u različitim populacijama, kao što je azijska (41,5 – 62,5 %), mješovita brazilska (40,0 – 48,0 %), te europska (35,8 – 54,3 %) [171, 172, 173]. Nadalje, zemljopisna stratifikacija među pripadnicima bijele rase europskog podrijetla koji ne žive u Europi otkriva da je rizik za rađanje djeteta s DS-om veći nego li kod pripadnika bijele rase koji žive u Europi. Međutim, kod stanovnika europskog podrijetla bijele rase koji žive u mediteranskim regijama nije primijećen značajan učinak. Autori objašnjavaju dobivene rezultate geografskim i prehrambenim čimbenicima koji mogu neutralizirati negativne učinke varijanti gena [45, 173].

Nakon početnog neuspjeha u dokazivanju povezanosti polimorfizama *MTRR* rs1801394 i PSG-a u Nizozemskoj populaciji [174, 175], Zeng i suradnici (2011) su prvi put utvrdili značajan utjecaj *MTRR* rs1801394 u razvoju nesindromskih PSG-a, pri čemu je utvrđen omjer rizika od 1,5 puta [176].

Meta-analiza provedena 2014. godine, uključila je 3592 slučaja i 3638 kontrola iz osam studija objavljenih prije 2013. godine. Utvrdila je povezanosti *MTRR* 1801394 i nesindromskih PSG-a. Nadalje, rezultati učinka etničke pripadnosti otkrili su povezanost između GG genotipa i PSG-a u Azijata. Razlike u populacijama autori objašnjavaju manjim uzorkom u bijeloj populaciji, ali i utjecajem genetske pozadine te izloženošću čimbenicima okoliša među populacijama [177].

Iste godine provedena meta-analiza Cai i suradnika potvrdila je rs1801394 kao čimbenik rizika za sindromske i nesindromske PSG ($p = 0,001$), dok je povezanost između rs1801394 i PSG-a pronađena u obje podskupine (kineska ($p = 0,001$); nekineska ($p = 0,031$) [161].

Kasnije provedena meta-analiza Xu i suradnika (2018), koja je obuhvatila 17 studija, pokazala je da polimorfizam rs1801394 predstavlja čimbenik rizika za sindromske i nesindromske PSG u dominantnom, recesivnom, aditivnom i modelu alela. Nadalje, analiza podskupina prema etničkoj pripadnosti utvrdila je značajnu korelaciju rs1801394 s rizikom za PSG kod Azijata. Prema vrsti PSG-a, rs1801394 je značajno povezan s rizikom za VSD-a [140], što ukazuje na značajan utjecaj etničkog podrijetla na vrste PSG-a u različitim populacijama [169].

Nedavno provedena studija, koja je obuhvatila dvanaest polimorfizama u genu *MTRR* majke, pokazala je da je pet od njih (rs1532268, rs1802059, rs2287779, rs16879334 i rs2303080) čimbenik rizika za nesindromske PSG kod djece, dok polimorfizam rs1801394 nije identificiran kao čimbenik rizika [169].

Christensen i suradnici (2013) utvrdili su povezanost genotipa *MTRR* rs1801394 GG i AG sa smanjenim rizikom za PSG kod djece, posebno za VSD i stenozu aortne valvule [120]. Kasnije istraživanje Wang i suradnika potvrdilo je protektivni učinak polimorfizma rs1801394 za TOF ($p = 0,026$) i pulmonalnu atreziju PA/VSD ($p = 0,021$) [164].

Rezultati istraživanja na uzorku osoba s DS-om nisu jednoznačni. U istraživanju koje su proveli Asim i suradnici (2017), *MTRR* rs1801394 identificiran je kao čimbenik rizika za PSG u indijskoj populaciji (AG naspram AA; $p < 0,001$; dominantni model AG + GG naspram AA; $p = 0,20$) [178]. Povezanost *MTRR* rs1801394 i PSG-a kod osoba s DS-om nije potvrđena u američkoj [165] i hrvatskoj populaciji [17].

1.3.2.1.4. Varijante gena *DNK* metiltransferaza

Metilacija DNK, zajedno s posttranslacijskim modifikacijama histona i utišavanjem gena ovisnim o mikroRNK, predstavlja osnovni epigenetički mehanizam putem kojeg okolišni čimbenici moduliraju ekspresiju gena, neovisno o nukleotidnom slijedu DNK. Ova regulacija je esencijalna u brojnim staničnim procesima tijekom normalnog razvoja organizma, ali također ima značajnu ulogu u razvoju patoloških procesa u stanici i organizmu [179]. Međutim, dokazi sugeriraju da

povezanost metilacije DNK s ekspresijom gena ovisi o lokaciji metilacije unutar sekvence gena. Metilacija DNK u promotorskoj regiji gena dovodi do smanjene ekspresije, dok metilacija u samom genu, odnosno transkripcijskoj jedinici gena potiče ekspresiju gena [13, 180, 181, 182]. Geni koji su stalno aktivni, poznati kao kućepaziteljski geni (engl. *housekeeping genes*), ostaju nemetilirani jer su ključni za normalno funkcioniranje stanice. Obrasci metilacije DNK variraju ovisno o razvojnem stupnju i tipu tkiva [183, 184, 185].

Kao što je prethodno istaknuto, ciklus folata i ciklus metionina su dva ključna procesa u sintezi i prijenosu metilnih skupina, koji su od vitalnog značaja za reakcije metilacije. Prilikom dodavanja metilne skupine s donora SAM-a, koji nastaje u ciklusu metionina, na peti ugljikov atom nukleotida citozina, formira se 5-metilcitozin (engl. *5-methylcytosine*, *5mC*). Metilirani citozin je sastavni dio CpG (engl. *cytosine-phosphate-guanine*) dinukleotida, koji se najčešće nalaze u promotorskim regijama gena. Osim toga, višestruki uzastopni CpG dinukleotidi formiraju CpG otoke (engl. *CpG islands*, *CGIs*), koji se nalaze ne samo u promotorskim regijama, već i drugdje u ljudskom genomu [186]. DNK metiltransferaze su enzimi koji sudjeluju u metilaciji 5mC, a obrasci metilacije DNK uspostavljaju se tijekom embriogeneze putem *de novo* DNMT3A i DNMT3B. Održavanje uzoraka metilacije kroz sukcesivne stanične diobe omogućuje DNMT1, koja katalizira replikaciju metilacijskih obrazaca iz kalupa u novosintetizirane DNK lance nakon replikacije DNK. U nedostatku aktivnosti održavanja, oznake metilacije postupno se brišu tijekom staničnih dioba, proces poznat kao 'pasivna demetilacija' (za razliku od aktivnog uklanjanja oznaka metilacije čimbenicima demetilacije). Osim svoje uloge u uspostavljanju *de novo* metilacijskih uzoraka, DNMT3A i DNMT3B također mogu sudjelovati u održavanju metilacije, bilo izravno ili putem očitavanja aktivnosti DNMT1 [179, 187].

Chowdhury i suradnici (2011) su utvrdili razlike u obrascu metilacije majki djece s nesindromskim PSG-ma, pri čemu je u ispitivanoj skupini primijećena hipermetilacija na većini različito metiliranih lokusa [188]. Nadalje, metilacija DNK ima ključnu ulogu u ekspresiji gena relevantnih za kardiogenezu [185, 188, 189]. Chamberlain i suradnici analizirali su status metilacije DNK tijekom kardiogeneze u animalnom modelu te su utvrdili više od 50 % promjena u statusu metilacije gena koji su uključeni u razvoj srca i rast srčanog tkiva [20].

Nedavno istraživanje Mouat i suradnika (2023) identificiralo je i karakteriziralo razlike u metilaciji DNK u novorođenčadi s DS-om i PSG-om. Utvrđena je globalna hipometilacija CpG dinukleotida kod novorođenčadi muškog spola s DS-om i i PSG-om [190]. Niža globalna CpG metilacija u uzorku mrlja sasušene krvi (NDBS, engl. *newborn dried blood spots*) i visoki udio crvenih krvnih stanica s jezgrom (nRBC, engl. *nucleated red blood cells*) su moguća objašnjenja dobivenih rezultata. Prethodna istraživanja sugeriraju snažan utjecaj proporcija nRBC-a na

globalnu metilaciju DNK u DS novorođenčadi, što je povezano s fetalnom hipoksemijom uzrokovanom povišenim eritropoetinom [191, 192]. Visoki udjeli nRBC-a češći su kod osoba s PSG-om, osobito u DSPSG+, zbog uočenih abnormalnosti posteljice u fetusa s trisomijom 21. Rezultati istraživanja podupiru hipotezu da epigenetika može odražavati varijabilnost fenotipova kod osoba s DS-om, posebno u vezi s prirođenim srčanim greškama [190].

Studija Fang i suradnika (2021) pokazala je da *Dnmt1* utječe na kardiomiocyte u embrionalnom razvoju, regulirajući metilaciju DNK, ekspresiju gena i funkcije stanica. Studija sugerira da smanjena ekspresija *Dnmt1* i posljedična hipometilacija DNK mogu imati potencijalni zaštitni učinak protiv patoloških srčanih promjena [193]. Nadalje, istraživanja na eksperimentalnim organizmima pokazuju da su *Dnmt3a* i *Dnmt3b* uključene u reprogramiranje metilacije DNK tijekom diferencijacije kardiomiocita [20, 194]. Joshi i suradnici (2022) su otkrili značajno smanjene razine ekspresije *DNMT3A* i *3B* u pacijenata s PSG-om, dok ekspresija *DNMT1* i *MBD2* (engl. *methyl-CpG binding domain protein 2*) nije pokazala značajne razlike [195]. Studije su pokazale da smanjena aktivnost *DNMT3A* povezana s hipometilacijom DNK može doprinijeti patologiji srca [196], dok je prekomjerna ekspresija *DNMT3A* povezana s srčanom fibrozom [197].

Varijante gena *DNMT*, uključujući *DNMT1* (rs2228611), *DNMT3A* (rs1550117) i *DNMT3B* (rs1569686; rs2424913), prepoznate su kao rizični ili protektivni čimbenici za različita stanja ili bolesti [198, 199, 200, 201, 202, 203].

Varijanta gena *DNMT1* +32204 A>G supstitucija (dbSNP rs2228611) smještena u egzonu 17, ima potencijalnu regulatornu ulogu u alternativnom spajanju i rezultira sinonimnom varijantom na aminokiselini 463 (prolin u prolin) [133, 204, 205]. Varijanta *DNMT3A* (dbSNP rs1550117) nalazi se uzvodno od mjesta početka transkripcije na -448 (A>G supstitucija) paru baza regije promotora, značajno smanjuje transkripcijsku aktivnost gena *DNMT3A*, što rezultira smanjenom regulacijom ekspresije *DNMT3A* [133, 206]. Dva polimorfizma *DNMT3B*, (dbSNP rs1569686 i rs2424913), nalaze se uzvodno od mjesta početka transkripcije na -579 (G>T supstitucija) odnosno -149 (C>T supstitucija) paru baza regije promotora [133, 207]. Alel T rs2424913 povećava aktivnost promotora za 30% [208, 209] i utječe na mjesto vezivanja miRNA [210]. Funkcionalna uloga *DNMT3B* rs1569686 do danas nije u potpunosti razjašnjena, ali *in silico* analize ukazuju na mogući utjecaj T alela na aktivnost vezanu uz nekoliko transkripcijskih faktora [210].

U jednom od rijetkih istraživanja koja su istraživala povezanost varijanti gena *DNMT1* s PSG-ma, Wang i suradnici (2015) istraživali su povezanost četiri polimorfizma *DNMT1*: rs16999593, rs2228612, rs2288349 i rs10420321. Potvrdili su povezanost *DNMT1* rs16999593,

rs2228612 i rs10420321 s rizikom za razvoj PSG-a [196]. Nadalje, Lei i suradnici (2017) istraživali su povezanost varijanti u genu *DNMT1* (rs16999593, rs16999358, rs2228611) i *DNMT3A* (rs2276599 i rs2276598) s transpozicijom velikih arterija (TGA, engl. *transposition of the great arteries*). Utvrdili su da su spol i rs16999358 neovisni čimbenici rizika za kompletnu TGA, dok je genotip rs16999593 CT prepoznat kao protektivni čimbenik [211]. Lyu i suradnici (2020) utvrdili su povezanost *DNMT3A* rs 11892646 s razvojem konotrunkalnih srčanih defekata [212].

Smanjena ekspresija *DNMT1* i *DNMT3B* također je povezana s patogeneom TOF-a [213]. Istraživanje koje su proveli Noori i suradnici (2020) u jugoistočnom Iranu otkrilo je da *GATA4* (engl. *GATA binding protein 4*) rs4841587 TG genotip pokazuje povezanost s VSD-om, dok se *DNMT1* rs6999593 AG genotip povezuje s VSD-om i TOF-om u pacijenata s nesindromskim PSG-ma [214].

Među pretilim ženama, dojenčad s *DNMT3B* rs6058893 AG genotipom imala su 1,73 puta veći rizik za razvoj opstruktivnog srčanog defekta (OHD, engl. *Obstructive Heart Defects*) u usporedbi s GG genotipom. Nasuprot tome, među ženama normalne tjelesne težine, dojenčad s rs6058893 AG genotipom imala su smanjeni rizik od OHD u usporedbi s dojenčadi žena normalne tjelesne težine koje su nosile GG genotip [215].

Varijante gena *DNMT* predstavljaju rizik za različite kardiovaskularne bolesti, pri čemu *DNMT1* rs2228611 predstavlja čimbenik rizika za razvoj esencijalne hipertenzije kod muškaraca [216], dok se *DNMT3B* rs1569686 povezuje s koronarnom restenozom. *DNMT3B* rs1569686 TT genotip bio je češći među bolesnicima mlađima od 65 godina i u podskupini bolesnika koji su imali restenozu nakon 12 mjeseci [135].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Varijante gena metabolizma folata i metionina mogu utjecati na obrazac metilacije DNK. Izmijenjeni obrazac metilacije gena koji sudjeluju u kardiogenezi može biti potencijalni čimbenik rizika za razvoj PSG-a.

Stoga je temeljna pretpostavka ovog retrospektivnog istraživanja da polimorfizmi jednog nukleotida gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* pojedinačno ili u kombinaciji, predstavljaju predisponirajuće čimbenike za razvoj prirodnih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom.

Osnovni cilj istraživanja je istražiti postoji li povezanost između polimorfizama jednog nukleotida gena *MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131, *MTRR* rs1801394, *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117, *DNMT3B* rs1569686 i *DNMT3B* rs2424913 s razvojem prirodnih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom, pojedinačno ili u kombinaciji.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. odrediti distribuciju i učestalost genotipova i alela polimorfizama jednog nukleotida gena *MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131, *MTRR* rs1801394, *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117, *DNMT3B* rs1569686 i *DNMT3B* rs2424913 u svih ispitanika,
2. utvrditi povezanost genotipova i alela polimorfizama jednog nukleotida gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* (pojedinačno i/ili u kombinaciji) s predispozicijom za prirodene srčane greške u svih ispitanika i
3. utvrditi povezanost genotipova i alela polimorfizama jednog nukleotida gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* (pojedinačno i/ili u kombinaciji) s vrstom prirodene srčane greške i spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirodnom srčanom greškom.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Vrsta istraživanja, skupine ispitanika, prikupljanje materijala

Ispitanici za ovo retrospektivno istraživanje prikupljeni su u okviru znanstveno-istraživačkog projekta "Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba sa sindromom Down" (918.10.0230/uniri.-biomed 18-120). Informirani pristanak za sudjelovanje u projektu dalo je 270 roditelja ili staratelja osoba s DS-om kojima je citogenetičkom analizom utvrđena trisomija kromosoma 21.

U ovom retrospektivnom istraživanju korišteni su uzorci genomske DNK, koja je izolirana iz stanica limfocita periferne krvi i epitela bukalne sluznice, prema standardnom protokolu proizvođača (Qiagen FlexiGene® DNA Kit (250), Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka i QIAamp® DNA Mini Kit (50), Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) te je uskladištena na -20°C u Tris-EDTA (engl. *ethylenediamine tetra-acetic acid, EDTA*) puferu na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci. Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNK određene su spektrofotometrom (Thermo Scientific BioMate 3, Thermo Electron Scientific Instrument Corporation, Madison, SAD).

U istraživanje je uključeno 258 ispitanika podijeljenih u dvije skupine na temelju prisutnosti PSG-e. Osnovni kriterij za uključivanje ispitanika u ovo istraživanje bila je kvaliteta izolirane DNK čija je čistoća bila u rasponu od $A_{260}/A_{280} = 1,7$ do 1,9 te koncentracija.

U prvu skupinu uključeno je 134 osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom (DSPSG+), dok je u drugu, kontrolnu skupinu, uključeno 124 osobe s Downovim sindromom, ali bez prirođene srčane greške (DSPSG-). Dodatno, svi ispitanici u skupini DSPSG+ osim kariotipa imali su i potvrđenu PSG-u, ultrazvukom pri rođenju. Važno je naglasiti da, budući da je ovo istraživanje fokusirano na prirođene srčane greške, ispitanici nisu bili usklađeni prema dobi.

3.2. Metode

3.2.1. Molekularno-genetička analiza

Na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci provedena je molekularno-genetička analiza varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*. Za utvrđivanje SNP-ova gena *MTHFR* 677C>T (rs1801133) i *MTHFR* 1298A>C (rs1801131), *MTRR* 66A>G (rs1801394), *DNMT1* +32204A/G (rs2228611), *DNMT3A* -448A/G (rs1550117),

DNMT3B -579G/T (rs1569686) i *DNMT3B* -149C/T (rs2424913) primijenjena je metoda polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (PCR-RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*), koja uključuje lančanu reakciju polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) i naknadnu restrikciju s odgovarajućim restrikcijskim enzimima. Umnožavanje ciljnih fragmenata molekule DNK provodilo se u termociklerima (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Njemačka i 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD). Nakon PCR reakcije, PCR produkti su cijepani odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama prema uputama proizvođača (New England Biolabs, Ipswich, MA, SAD).

Tablica 6 prikazuje polimorfizme jednog nukleotida istraživanih gena, sljedove nukleotida početnica, uvjete PCR reakcija, veličine PCR produkata, vrste restrikcijskih enzima, uvjete restrikcije i veličine restrikcijskih fragmenata za analizu polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*. Tablice 7 i 8 prikazuju sadržaj reakcijskih PCR i restrikcijskih smjesa za svaki polimorfizam pojedinačno. Za razdvajanje dobivenih PCR produkata i restrikcijskih fragmenata korištena je metoda elektroforeze na 3 % agaroznom gelu u koji je dodano 2 μ L bromofenol plave boje (engl. *brom phenol blue*, BPB) i 8 μ L PCR produkta, u trajanju od 60 minuta na 80V.

Rezultati su vizualizirani pod ultraljubičastim svjetlom transiluminatora (Uvitec, Cambridge, UK). Za određivanje veličine PCR produkata i restrikcijskih fragmenata primjenjivao se DNK standard veličine 50 bp ili 100 bp. Korištene su negativne kontrole kako bi se provjerila eventualna kontaminacija PCR reakcijske smjese. Radi provjere vjerodostojnosti rezultata, nasumično je ponovljeno 10 % svih uzoraka.

Tablica 6. Opis polimorfizama, početnica, uvjeta PCR i restrikcijskih reakcija, veličina PCR produkata i restrikcijskih fragmenata u analizi polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Polimorfizam gena (dbSNP rs) Pozicija	Uzvodna početnica Nizvodna početnica	Uvjeti PCR reakcije	PCR Produkt (bp)	Restrikcijski enzimi Uvjeti restrikcije Restrikcijski fragmenti (bp)	Reference
MTHFR 677C>T rs1801133 egzon kromosom 1	5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3' 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'	94 °C (2 min) 40x: 94 °C (30s), 62 °C (30s), 72 °C (30s) 72 °C (7 min)	198	HinfI 37 °C / 45 min C alel: 198 T alel: 175 i 23	[217]
MTHFR 1298A>C rs1801131 egzon kromosom 1	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA3' 5'CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG3'	92 °C (2 min) 40x: 92 °C (60s), 56 °C (60s), 72 °C (30s) 72 °C (7 min)	163	Mbo II 37 °C / preko noći A alel: 56, 31/30, 28, 18 C alel: 84, 31/30, 18	[217]
MTRR 66A>G rs1801394 egzon kromosom 5	5'CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT3' 5'CACTTCCCAACCAAAATCTTCAACG3'	92 °C (2 min) 35x: 92 °C (60s), 56 °C (60s), 72 °C (90s) 72 °C (7 min)	150	Afl III 37 °C / preko noći A alel: 150 G alel: 123 i 27	[218]
DNMT1 +32204 A/G rs2228611 egzon kromosom 19	5'-GTAAGTGAAGCACGGTACACCTG-3' 5'-TATGTTGTCCAGGCTCGTCTC-3'	94 °C (5 min) 35x: 94 °C (30s), 55 °C (30s), 72 °C (30s) 72 °C (5 min)	261	BcoDI 37 °C / 30 min A alel: 232 i 28 G alel: 108, 124 i 28	[219]
DNMT3A -448 A/G rs1550117 promotor kromosom 2	5'-ACACACCGCCCTCACCCCTT-3' 5'-TCCAGCAATCCCTGCCCA-3'	94 °C (5 min) 35x: 94 °C (30s), 55 °C (45s), 72 °C (30s) 72 °C (5 min)	358	HpyCH4III 37 °C / 60 min A alel: 246, 87 i 24 G alel: 152, 94, 87 i 24	[220]
DNMT3B -579 G/T rs1569686 promotor kromosom 20	5'-GAGGTCTCATTATGCCTAGG-3' 5'-GGGAGCTCACCTTCTAGAAA-3'	94 °C (5 min) 35x: 94 °C (30s), 49 °C (30s), 72 °C (30s) 72 °C (5 min)	225	PvuII-HF 37 °C / 30 min T alel: 132 i 93 G alel: 225	[221]
DNMT3B -149 C/T rs2424913 promotor kromosom 20	5'-TTGTCCTGAAGCTGGCTACC-3' 5'-ACCAGGAGAGAAGCCAACAG-3'	94 °C (5 min) 35x: 94 °C (30s), 54 °C (30s), 72 °C (30s) 72 °C (5 min)	431	AvrII 37 °C / 60 min C alel: T alel:	[199]

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; *DNMT* – DNA metiltransferaze; PCR – lančana reakcija polimerazom; RFLP – polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata; bp – bazni parovi

Tablica 7. Sadržaj PCR reakcijskih smjesa za analizu polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Sadržaj PCR reakcijske smjese	<i>MTHFR</i> rs1801133	<i>MTHFR</i> rs1801131	<i>MTRR</i> rs1801394	<i>DNMT1</i> rs2228611	<i>DNMT3A</i> rs1550117	<i>DNMT3B</i> rs1569686	<i>DNMT3B</i> rs2424913
10 x PCR pufer	1,5	1,5	1,5	1	1,5	1,5	1
25 mM MgCl	1,5	1,8	0,9	0,6	0,3	0,9	0,3
2 mM dNTP	0	0	0	0,3	0,45	0,45	0,3
10 mM dNTP	0,3	0,15	0,06	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	1,5	0	0
uzvodna početnica	0,75	0,6	0,27	0,1	0,15	0,15	0,1
nizvodna početnica	0,75	0,6	0,27	0,1	0,15	0,15	0,1
Taq DNK polimeraza	0,15	0,15	0,07	0,1	0,15	0,15	0,1
Bidestilirana voda	9,55	9,7	11,43	7,3	10,3	11,2	7,6
DNK	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PCR reakcijska smjesa (V)	15 µL	15 µL	15 µL	10 µL	15 µL	15 µL	10 µL

PCR – lančana reakcija polimerazom; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; *DNMT* – DNK metiltransferaze; MgCl – Magnezijev klorid; dNTP – Deoksinukleotid; DMSO – Dimetilsulfoksid; DNK – deoksiribonukleinska kiselina

Tablica 8. Sadržaj reakcijskih smjesa za restrikciju polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Sadržaj smjesa za restrikciju	<i>MTHFR</i> rs1801133	<i>MTHFR</i> rs1801131	<i>MTRR</i> rs1801394	<i>DNMT1</i> rs2228611	<i>DNMT3A</i> rs1550117	<i>DNMT3B</i> rs1569686	<i>DNMT3B</i> rs2424913
*Enzim	0,2	0,64	0,4	0,3	0,2	0,15	0,2
CutSmart pufer	2	2	0	3	2	1,5	2
NEBuffer 3	0	0	2,0	0	0	0	0
Bidestilirana voda	7,8	7,36	7,6	11,7	7,8	8,35	12,8
PCR produkt	10	10	10	5	10	10	5
restrikcijska smjesa (V)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

PCR – lančana reakcija polimerazom; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; *DNMT* – DNK metiltransferaze

*Pogledati tablicu 6. nazivi restrikcijskih enzima

3.2.2. Etički aspekti istraživanja

Istraživanje je provedeno kao retrospektivna studija u skladu s etičkim smjernicama koje imaju za cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja i sigurnost ispitanika. Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost kao i onih iz njih izvedenih (privatnost, povjerenje) – u skladu s Nürnberškim kodeksom (engl. *Nuremberg Code*) [222] i Helsinškom deklaracijom (engl. *Declaration of Helsinki*) [223] te ostalim mjerodavnim dokumentima. Tijekom istraživanja korišteni su uzorci DNK prikupljeni u sklopu znanstveno-istraživačkog projekata "Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba sa sindromom Down" (918.10.0230/uniri.-biomed 18-120) koji su pohranjeni na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Svi medicinski podaci i humani materijal prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je svaki ispitanik, odnosno njegovi roditelji/staratelji, upoznat sa svrhom i metodologijom istraživanja, i tek tada su dali pristanak za sudjelovanje u istraživanju, kao i suglasnost za korištenje pohranjene krvi i DNK uzorka. Znanstveno-istraživački projekt 'Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba sa sindromom Down' (918.10.0230/uniri.-biomed 18-120) odobren je od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Rijeka (Klasa: 003-05/20-1/09; Urbroj: 2170-29-02/1-20-1) i Medicinskog fakulteta u Rijeci (Klasa: 003-08/19-01/114; Urbroj: 2170-24-09-8-19-2). Tijekom istraživanja osigurana je privatnost (profesionalna tajna) ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka.

3.3. Statistička obrada podataka

U statističkoj obradi podataka korišteni su računalni programi Statistica za Windows, verzija 13.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) i MedCalc za Windows [224], verzija 14.12.0, za statističku obradu podataka. Za izračun statističke snage testa korišten je alat ClinCalc LLC [225]. Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) za očekivane frekvencije genotipova izračunata je pomoću online slobodno dostupnog kalkulatora (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Demografski i klinički podaci su opisani deskriptivnom statistikom, uključujući apsolutne i relativne frekvencije za kategoričke varijable, te prikladne mjere središnjice i raspršenja za numeričke varijable. Normalnost distribucije procijenjena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike u učestalosti odabranih SNP-ova gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* analizirane su korištenjem Pearsonovog hi-kvadrat (χ^2) testa i Fischerovog egzaktnog testa. Za analizu genetičke povezanosti genotipova, alela i genetičkih

modela (dominantn, recesivni, kodominantni model) s predispozicijom za PSG korišteni su omjeri izgleda (engl. *odds ratio*, OR) i pripadajući 95 %-tni intervali pouzdanosti (engl. *confidence intervals*, CI). Statistička značajnost postavljena je na razinu $p < 0,05$ za sve analize.

4. REZULTATI

U tablici 9 prikazani su demografski podaci za DSPSG+ ispitivanu i DSPSG- kontrolnu skupinu ispitanika, te raspodjela vrsta PSG-a prema spolu u DSPSG+ skupini. Istraživanje je uključilo 134 osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom (DSPSG+), od kojih je 69 muškaraca i 65 žena, s rasponom dobi od 0 do 27 godina. Također, uključeno je 124 osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške (DSPSG-), među kojima su 71 muškarac i 53 žene, s rasponom dobi od 0 do 55 godina. Najčešće vrste PSG-a bile su ASD: 36,57 %, nakon čega slijede VSD: 23,13 % i AVSD 23,13 %. Ostali fenotipovi PSG-a bili su zastupljeni u manjem postotku. Nije uočena statistički značajna razlika prema spolu ispitanika u kontekstu vrste prirodene srčane greške.

Tablica 9. Demografski podaci DSPSG+ (N=134) i DSPSG- (N=124) skupine i raspodjela vrsta PSG-a prema spolu u DSPSG+ skupini

Ispitanici	DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	Ukupno N (%)	
	134 (51,94)	124 (48,06)	258 (100)	
Spol				<i>p</i>
Muškarci	69 (51,49)	71 (57,26)	140 (54,26)	0,353
Žene	65 (48,51)	53 (42,74)	118 (45,74)	
Starosna dob	Medijan (raspon)			
	2 (0 – 27)	2,5 (0 – 55)		
Vrsta prirodene srčane greške	DSPSG+ Muškarci N (%)	DSPSG+ Žene N (%)	Ukupno N (%)	<i>p</i>
Atrijski septalni defekt	24 (34,78)	25 (38,46)	49 (36,57)	0,659
Ventrikularni septalni defekt	18 (26,09)	13 (20,00)	31 (23,13)	0,404
Atriventrikularni septalni defekt	14 (20,29)	17 (26,15)	31 (23,13)	0,421
Fallotova tetralogija	3 (4,35)	1 (1,54)	4 (2,99)	0,340
Prirodene malformacije velikih arterija	4 (5,80)	3 (4,62)	7 (5,22)	0,759
Ostalo*	6 (8,70)	6 (9,23)	12 (8,96)	0,913
Ukupno	69 (51,49)	65 (48,51)	134 (100)	

DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *p* – vrijednost; *kombinacije različitih vrsta prirodnih srčanih grešaka

4.1. Analiza genotipova i alela gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*, pojedinačno i u kombinaciji

Molekularno-genetičku analizu polimorfizama nije bilo moguće provesti kod 5 % (258/270) odabranih ispitanika, najvjerojatnije zbog degradacije DNK čija je koncentracija i čistoća bila zadovoljavajuća prilikom odabira. Konkretno, analiza za *MTRR* rs1801394 nije provedena kod jednog ispitanika (1/258), za *DNMT1* rs2228611 kod devet ispitanika (9/258), za *DNMT3A* rs1550117 kod trinaest ispitanika (13/258), te za *DNMT3B* rs1569686 (4/258) i rs2424913 (18/258) kod četiri odnosno osamnaest ispitanika.

Distribucija i učestalost genotipova i alela varijanti gena *MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131, *MTRR* rs1801394, *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117, *DNMT3B* rs1569686 i rs2424913 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prikazana je u tablici 10.

Učestalost i distribucija genotipova i alela za istraživane varijante gena prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi bile su u genetičkoj ravnoteži, osim u dva slučaja: *MTHFR* rs1801131 u kontrolnoj skupini ($p = 0,004$) i *DNMT1* rs2228611 u ispitivanoj skupini ($p = 0,004$). Konkretno, za varijante gena, p -vrijednosti su bile sljedeće:

- *MTHFR* rs1801133 u DSPSG+ skupini $p = 0,277$, a u DSPSG- skupini $p = 0,689$;
- *MTHFR* rs1801131 u DSPSG+ skupini $p = 0,053$;
- *MTRR* rs1801394 u DSPSG+ skupini $p = 0,543$, a u DSPSG- skupini $p = 0,068$;
- *DNMT1* rs2228611 u DSPSG- skupini $p = 0,130$;
- *DNMT3A* rs1550117 u DSPSG+ skupini $p = 0,958$, a u DSPSG- skupini $p = 0,763$;
- *DNMT3B* rs1569686 u DSPSG+ skupini $p = 0,682$, a u DSPSG- skupini $p = 0,189$;
- *DNMT3B* rs2424913 u DSPSG+ skupini $p = 0,083$, a u DSPSG- skupini $p = 0,063$.

U skupini DSPSG+ utvrđena je statistički značajno veća učestalost *MTHFR* rs1801131 AA genotipa ($p = 0,047$) te rizičnog *DNMT3B* rs2424913 TT genotipa ($p = 0,019$). Dok je u skupini DSPSG- utvrđena značajno veća učestalost *DNMT3B* rs2424913 CT genotipa ($p = 0,021$). Za ostale istraživane genotipove i alele nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($p > 0,05$) (tablica 10).

Tablica 10. Učestalost genotipova i alela varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* u ispitanika (N=134) i kontrola (N=124)

				DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	χ^2	<i>p</i>
<i>MTHFR</i>	rs1801133	genotip	CC	51 (38,1)	58 (46,7)	2,00	0,157
			CT	68 (50,7)	55 (44,4)	1,05	0,304
			TT	15 (11,2)	11 (8,9)	0,39	0,536
	alel	C	170 (63,4)	171 (69,9)	1,75	0,186	
		T	98 (36,6)	77 (31,1)			
	rs1801131	genotip	AA	76 (56,7)	55 (44,4)	3,94	0,047
			AC	55 (41,1)	65 (52,4)	3,35	0,067
			CC	3 (2,2)	4 (3,2)	0,24	0,457
alel		A	207 (77,2)	175 (70,6)	2,98	0,084	
	C	61 (22,8)	73 (29,4)				
<i>MTRR</i>	rs1801394	genotip	AA	32 (24,1)	23 (18,5)	1,16	0,282
			AG	70 (52,6)	72 (58,1)	0,77	0,381
			GG	31 (23,3)	29 (23,4)	0,01	0,928
		alel	A	134 (50,4)	118 (47,6)	0,40	0,526
			G	132 (49,6)	130 (52,4)		
<i>DNMT1</i>	rs2228611	genotip	AA	31 (24,0)	38 (31,7)	1,81	0,179
			AG	80 (62,0)	66 (55,0)	1,26	0,262
			GG	18 (14,0)	16 (13,3)	0,02	0,887
		alel	A	142 (55,0)	142 (59,2)	0,86	0,352
			G	116 (45,0)	98 (40,8)		
<i>DNMT3A</i>	rs1550117	genotip	AA	1 (0,8)	1 (0,8)	0,00	0,737
			AG	21 (16,7)	17 (14,3)	0,27	0,607
			GG	104 (82,5)	101 (84,9)	0,24	0,621
		alel	A	23 (10,0)	19 (8,0)	0,20	0,651
			G	229 (90,0)	219 (92,0)		
<i>DNMT3B</i>	rs1569686	genotip	GG	50 (38,5)	45 (36,3)	0,13	0,721
			TG	63 (48,5)	65 (52,4)	0,40	0,528
			TT	17 (13,0)	14 (11,3)	0,19	0,664
	alel	G	163 (63,0)	155 (63,0)	0,00	0,964	
		T	97 (37,0)	93 (38,0)			
	rs2424913	genotip	CC	41 (33,1)	35 (30,2)	0,23	0,630
			CT	52 (41,9)	66 (56,9)	5,37	0,021
			TT	31 (25,0)	15 (12,9)	5,63	0,018
		alel	C	134 (54,0)	136 (59,0)	1,03	0,311
T	114 (46,0)		96 (41,0)				

DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirodnom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodne srčane greške; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metil-tetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; *DNMT* – DNK metiltransferaza

Utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova polimorfizama *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTHFR* rs1801133 CT (tablica 11) *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTHFR* rs1801131 AA (tablica 12), *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTRR* rs1801394 AG (tablica 13), *DNMT1* rs2228611 AG i *MTHFR* rs1801131 AA (tablica 14), *MTHFR* rs1801133 CT i *MTHFR* rs1801131 AA (tablica 15), te *MTHFR* rs1801131 AA i *MTRR* rs1801394 AA (tablica 16) u DSPG+ skupini u odnosu na DSPG- skupinu.

Tablica 11. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

<i>DNMT3B</i> rs2424913	<i>MTHFR</i> rs1801133				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	CC	17 (13,71)	13 (11,21)	1,26 (0,58 – 2,2)	0,559
CC	CT	20 (16,13)	19 (16,38)	0,98 (0,49 – 1,95)	0,958
CC	TT	4 (3,23)	3 (2,59)	1,26 (0,27 – 5,73)	0,769
CT	CC	23 (18,55)	31 (26,72)	0,62 (0,34 – 1,15)	0,131
CT	CT	21 (16,94)	27 (23,28)	0,67 (0,36 – 1,27)	0,221
CT	TT	8 (6,45)	8 (6,90)	0,93 (0,34 – 2,57)	0,890
TT	CC	8 (6,45)	10 (8,62)	0,73 (0,28 – 1,92)	0,525
TT	CT	21 (16,94)	5 (4,31)	4,53 (1,65 – 12,45)	0,003
TT	TT	2 (1,61)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
UKUPNO		124	116		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 12. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

<i>DNMT3B</i> rs2424913		<i>MTHFR</i> rs1801131			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	AA	23 (18,55)	15 (12,93)	1,53 (0,76 – 3,11)	0,236
CC	AC	16 (12,90)	20 (17,24)	0,71 (0,35 – 1,45)	0,348
CC	CC	2 (1,61)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
CT	AA	28 (22,58)	32 (27,59)	0,77 (0,43 – 1,38)	0,371
CT	AC	23 (18,55)	31 (26,72)	0,62 (0,34 – 1,15)	0,131
CT	CC	1 (0,81)	3 (2,59)	0,31 (0,03 – 2,98)	0,309
TT	AA	21 (16,94)	5 (4,31)	4,53 (1,65 – 12,45)	0,003
TT	AC	10 (8,06)	10 (8,62)	0,93 (0,37 – 2,32)	0,876
TT	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
UKUPNO		124	116		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 13. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

<i>DNMT3B</i> rs2424913		<i>MTRR</i> rs1801394			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	AA	11 (8,87)	6 (5,17)	1,78 (0,64 – 4,99)	0,270
CC	AG	22 (17,74)	21 (18,10)	0,98 (0,50 – 1,89)	0,942
CC	GG	8 (6,45)	8 (6,90)	0,93 (0,34 – 2,57)	0,890
CT	AA	10 (8,06)	10 (8,62)	0,93 (0,37 – 2,32)	0,876
CT	AG	27 (21,77)	39 (33,62)	0,55 (0,31 – 0,98)	0,041
CT	GG	15 (12,10)	17 (14,66)	0,80 (0,38 – 1,69)	0,561
TT	AA	6 (4,84)	6 (5,17)	0,93 (0,29 – 2,98)	0,906
TT	AG	19 (15,32)	7 (6,03)	2,82 (1,14 – 6,98)	0,025
TT	GG	6 (4,84)	2 (1,72)	2,90 (0,57 – 14,66)	0,198
UKUPNO		124	116		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 14. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=129) i kontrola (N=120)

<i>DNMT1</i> rs2228611	<i>MTHFR</i> rs1801131				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	AA	19 (14,73)	19 (15,83)	0,92 (0,46 – 1,83)	0,809
AA	AC	11 (8,53)	19 (15,83)	0,50 (0,23 – 1,09)	0,081
AA	CC	1 (0,78)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	AA	46 (35,66)	28 (23,33)	1,82 (1,04 – 3,17)	0,035
AG	AC	32 (24,81)	36 (30,00)	0,77 (0,44 – 1,35)	0,359
AG	CC	2 (1,55)	2 (1,67)	0,93 (0,13 – 6,70)	0,942
GG	AA	10 (7,75)	6 (5,00)	1,60 (0,56 – 4,54)	0,380
GG	AC	8 (6,20)	8 (6,67)	0,93 (0,34 – 2,55)	0,881
GG	CC	0 (0,00)	2 (1,67)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
UKUPNO		129	120		

DNMT1 – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 15. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* rs1801133 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=134) i kontrola (N=124)

<i>MTHFR</i> rs1801133	<i>MTHFR</i> rs1801131				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	AA	19 (14,18)	20 (16,13)	0,86 (0,43 – 1,70)	0,662
CC	AC	29 (21,64)	34 (27,42)	0,73 (0,41 – 1,29)	0,281
CC	CC	3 (2,24)	4 (3,23)	0,67 (0,15 – 3,13)	0,628
CT	AA	42 (31,34)	25 (20,16)	1,81 (1,02 – 3,20)	0,042
CT	AC	26 (19,40)	30 (24,19)	0,75 (0,42 – 1,37)	0,352
CT	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
TT	AA	15 (11,19)	10 (8,06)	1,44 (0,62 – 3,33)	0,398
TT	AC	0 (0,00)	1 (0,81)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
TT	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
UKUPNO		134	124		

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 16. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* rs1801131 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=133) i kontrola (N=124)

<i>MTHFR</i> rs1801131	<i>MTRR</i> rs1801394				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	AA	19 (14,29)	8 (6,45)	2,42 (1,02 – 5,74)	0,046
AA	AG	38 (28,57)	33 (26,61)	1,10 (0,64 – 1,91)	0,726
AA	GG	19 (14,29)	14 (11,29)	1,31 (0,63 – 2,74)	0,474
AC	AA	13 (9,77)	15 (12,10)	0,79 (0,36 – 1,73)	0,551
AC	AG	30 (22,56)	36 (29,03)	0,71 (0,41 – 1,25)	0,236
AC	GG	11 (8,27)	14 (11,29)	0,71 (0,31 – 1,63)	0,416
CC	AA	0 (0,0)	0 (0,0)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
CC	AG	2 (1,50)	3 (2,42)	0,62 (0,10 – 3,75)	0,599
CC	GG	1 (0,75)	1 (0,81)	0,93 (0,06 – 15,06)	0,960
UKUPNO		133	124		

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodne srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Značajno veća učestalost kombinacije genotipova polimorfizama *DNMT3A* rs1550117 GG i *DNMT3B* rs2424913 CT (tablica 17), *DNMT3B* rs1569686 TT i *MTHFR* rs1801133 CC (tablica 18), *DNMT3B* rs1569686 GG i *MTHFR* rs1801131 AC (tablica 19) te *DNMT3B* rs2424913 CT i *MTRR* rs1801394 AG (tablica 13) utvrđena je u skupini DSPSG- u odnosu na DSPSG+ skupinu. Ostale kombinacije genotipova polimorfizama *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* nisu se statistički značajno razlikovale između ispitivanih skupina ($p > 0,05$) (Prilog 4. tablice od 20 do 31).

Tablica 17. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *DNMT3B* rs2424913 u ispitanika (N=123) i kontrola (N=115)

<i>DNMT3A</i> rs1550117		<i>DNMT3B</i> rs2424913			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	CC	0 (0,00)	1 (0,87)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	CT	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	TT	1 (0,81)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	CC	6 (4,88)	7 (6,09)	0,79 (0,26 – 2,43)	0,682
AG	CT	10 (8,13)	9 (7,83)	1,04 (0,41 – 2,66)	0,931
AG	TT	5 (4,07)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
GG	CC	35 (28,46)	26 (22,61)	1,36 (0,76 – 2,45)	0,303
GG	CT	42 (34,15)	57 (49,57)	0,53 (0,31 – 0,89)	0,016
GG	TT	24 (18,51)	15 (13,04)	1,62 (0,80 – 3,26)	0,180
UKUPNO		123	115		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 18. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs 1569686 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=130) i kontrola (N=124)

<i>DNMT3B</i> rs1569686		<i>MTHFR</i> rs1801133			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	CC	23 (17,69)	21 (16,94)	1,05 (0,55 – 2,02)	0,873
GG	CT	24 (18,46)	20 (16,13)	1,18 (0,61 – 2,26)	0,624
GG	TT	3 (2,31)	4 (3,23)	0,71 (0,16 – 3,23)	0,657
TG	CC	23 (17,69)	28 (22,58)	0,74 (0,40 – 1,37)	0,332
TG	CT	30 (23,08)	30 (24,19)	0,94 (0,53 – 1,68)	0,834
TG	TT	10 (7,69)	7 (5,65)	1,39 (0,51 – 3,78)	0,516
TT	CC	2 (1,54)	9 (7,26)	0,20 (0,04 – 0,94)	0,042
TT	CT	13 (10,00)	5 (4,03)	2,64 (0,91 – 7,65)	0,073
TT	TT	2 (1,54)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
UKUPNO		130	124		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 19. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs 1569686 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=130) i kontrola (N=124)

<i>DNMT3B</i> rs1569686	<i>MTHFR</i> rs1801131				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- N (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	AA	32 (24,62)	19 (15,32)	1,80 (0,96 – 3,39)	0,067
GG	AC	15 (11,54)	26 (20,97)	0,49 (0,25 – 0,98)	0,044
GG	CC	3 (2,31)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
TG	AA	32 (24,62)	32 (25,81)	0,94 (0,53 – 1,65)	0,827
TG	AC	31 (23,85)	29 (23,39)	1,03 (0,57 – 1,83)	0,931
TG	CC	0 (0,00)	4 (3,23)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
TT	AA	11 (8,46)	4 (3,23)	2,77 (0,86 – 8,95)	0,088
TT	AC	6 (4,62)	10 (8,06)	0,55 (0,19 – 1,57)	0,264
TT	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
UKUPNO		130	124		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Analizirali smo i povezanost genetičkih modela s predispozicijom za prirodene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom. Utvrđena je statistički značajna asocijacija predispozicije za PSG i recesivnog genetičkog modela (AA vs AC+CC) za *MTHFR* rs1801131 ($p = 0,047$) kao i za dominantni (CC+CT vs TT) ($p = 0,019$) i kodominantni model (TT vs CT) ($p = 0,008$) za *DNMT3B* rs2424913 (tablica 32).

Tablica 32. Povezanost genetičkih modela gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s predispozicijom za prirodene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom

		DPSG+ vs DPSG-		
		Genetički model	OR (95% CI)	p
<i>MTHFR</i> rs1801133	Dominantni	CC+CT vs TT	1,29 (0,57-2,93)	0,536
	Recesivni	CC vs CT+TT	1,43 (0,87-2,34)	0,157
	Kodominantni	CC vs TT	1,55 (0,65-3,68)	0,319
		CC vs CT	1,40 (0,83-2,35)	0,196
		TT vs CT	0,90 (0,38-2,13)	0,822
<i>MTHFR</i> rs1801131	Dominantni	AA+AC vs CC	0,68 (0,15-3,13)	0,457
	Recesivni	AA vs AC+CC	0,60 (0,37-0,99)	0,047
	Kodominantni	AA vs CC	0,54 (0,11-2,52)	0,341
		AA vs AC	0,61 (0,37-1,00)	0,054
		CC vs AC	1,12 (0,24-5,25)	0,596
<i>MTRR</i> rs1801394	Dominantni	AA+AG vs GG	0,99 (0,55-1,77)	0,988
	Recesivni	AA vs AG+GG	0,71 (0,39-1,31)	0,282
	Kodominantni	AA vs GG	0,76 (0,36-1,60)	0,483
		AA vs AG	0,69 (0,37-1,31)	0,263
		GG vs AG	0,90 (0,49-1,66)	0,758
<i>DNMT1</i> rs2228611	Dominantni	AA+AG vs GG	1,05 (0,51-2,17)	0,886
	Recesivni	AA vs AG+GG	1,46 (0,83-2,55)	0,179
	Kodominantni	AA vs GG	1,37 (0,60-3,14)	0,444
		AA vs AG	1,48 (0,83-2,64)	0,177
		GG vs AG	1,07 (0,50-2,27)	0,845
<i>DNMT3A</i> rs1550117	Dominantni	AA+AG vs GG	0,84 (0,42-1,66)	0,621
	Recesivni	AA vs AG+GG	1,05 (0,06-17,13)	0,736
	Kodominantni	AA vs GG	1,02 (0,06-16,68)	0,743
		AA vs AG	1,23 (0,07-21,24)	0,703
		GG vs AG	1,19 (0,59-2,40)	0,608
<i>DNMT3B</i> rs1569686	Dominantni	GG+TG vs TT	1,18 (0,55-2,51)	0,664
	Recesivni	GG vs TG+TT	0,91 (0,54-1,51)	0,720
	Kodominantni	GG vs TT	1,09 (0,48-2,46)	0,830
		GG vs TG	0,87 (0,51-1,48)	0,614
		TT vs TG	0,79 (0,36-1,75)	0,574
<i>DNMT3B</i> rs2424913	Dominantni	CC+CT vs TT	2,24 (1,13-4,42)	0,019
	Recesivni	CC vs CT+TT	0,87 (0,50-1,50)	0,630
	Kodominantni	CC vs TT	1,76 (0,82-3,78)	0,145
		CC vs CT	0,67 (0,37-1,20)	0,179
		TT vs CT	0,38 (0,1-0,77)	0,008

DPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirodnom srčanom greškom; DPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; OR – Odds ratios; CI – 95% confidence intervals; *p* – vrijednost; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza; *DNMT* – DNK metiltransferaza

4.2. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s vrstom prirodene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom

Za analizu povezanosti varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s vrstom PSG-e, DSPSG+ skupina podijeljena je u dvije podskupine. U prvu podskupinu uključene su osobe s DS-om i jednom PSG-om što uključuje DS i AVSD (DSAVSD), DS i VSD (DSVSD) te DS i ASD (DSASD). U drugu podskupinu uključene su osobe s DS-om i kombiniranim prirodnim srčanim greškama ASD-om i VSD-om (DS ASD/VSD); AVSD-om i ASD-om (DS AVSD/ASD) te AVSD-om i VSD-om (DS AVSD/VSD). Međutim, broj ispitanika s kombiniranim srčanim greškama bio je premali za daljnju analizu. Stoga se povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* analizirala isključivo u prvoj podskupini u kojoj su ispitanici s jednom PSG-om; AVSD ili VSD ili ASD.

Utvrđena je statistički značajna povezanost između *DNMT3B* rs2424913 TT genotipa ($p = 0,028$), alel T ($p = 0,018$) te recesivnog genetičkog modela CC vs CT + TT ($p = 0,028$) s ASD-om (tablica 33). Nadalje, detektirana je statistički značajna povezanost *MTHFR* rs1801133 CT genotipa s ASD-om ($p = 0,040$) (tablica 34). U skupini s AVSD-om, utvrđena je statistički značajna povezanost s genotipom *MTRR* rs1801394 GG ($p = 0,023$) i alelom G ($p = 0,020$), kao i s dominantnim (AA + AG vs GG) ($p = 0,023$) te kodominantnim genetičkim modelom (AA + AG) ($p = 0,021$) (tablica 35). Za ostale ispitivane kombinacije nije utvrđena statistički značajna povezanost (Prilog 5. tablice od 43 do 60).

Tablica 33. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs2424913 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 45) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 79)

<i>DNMT3B</i> rs2424913		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	p
CC	Genotip	11 (24,4)	30 (38,0)	2,37	0,53 (0,23 – 1,20)	0,126
CT		18 (40,0)	35 (44,3)	0,22	0,84 (0,40 – 1,76)	0,642
TT		16 (35,6)	14 (17,7)	4,97	2,56 (1,11 – 5,93)	0,028
C	Alel	40 (44,4)	95 (60,1)	5,69	0,53 (0,31 – 0,90)	0,018
T		50 (55,6)	63 (39,9)			
Genetički model		CC+CT vs TT		2,37	0,53 (0,23 – 1,20)	0,126
		CC vs CT+TT		4,97	0,39 (0,17 – 0,90)	0,028
		CC vs TT		1,52	0,51 (0,18 – 1,49)	0,220
		CC vs CT		0,55	0,71 (0,29 – 1,74)	0,459
		TT vs CT		2,97	2,22 (0,89 – 5,55)	0,087

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; p – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 34. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs18301133 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 49) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 85)

<i>MTHFR</i> rs1801133		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	Genotip	14 (28,57)	36 (42,35)	2,52	0,54 (0,26 – 1,16)	0,114
CT		31 (63,27)	38 (44,71)	4,29	2,13 (1,04 – 4,38)	0,040
TT		4 (8,16)	11 (12,94)	0,31	0,60 (0,18 – 1,99)	0,293
C	Alel	59 (60,20)	110 (64,71)	0,54	0,83 (0,49 – 1,38)	0,462
T		39 (39,80)	60 (35,29)			
Genetički model		CC+CT vs TT		0,31	1,67 (0,50 – 5,57)	0,293
		CC vs CT+TT		2,52	0,54 (0,26 – 1,16)	0,114
		CC vs TT		0,05	1,07 (0,29 – 3,93)	0,600
		CC vs CT		3,53	0,48 (0,22 – 1,04)	0,062
		TT vs CT		1,02	0,45 (0,13 – 1,54)	0,156

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 35. Učestalost i povezanost varijante gena *MTRR* rs1801394 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 30) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 103)

<i>MTRR</i> rs1801394		DSAVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	4 (13,33)	28 (27,18)	1,74	0,41 (0,13 – 1,29)	0,149
AG		14 (46,67)	55 (53,40)	0,42	0,76 (0,34 – 1,73)	0,517
GG		12 (40,00)	20 (19,42)	5,39	2,77 (1,15 – 6,66)	0,023
A	Alel	22 (36,67)	111 (53,88)	5,51	0,50 (0,27 – 0,90)	0,020
G		38 (63,33)	95 (46,12)			
Genetički model		AA+AG vs GG		5,39	0,36 (0,15 – 0,87)	0,023
		AA vs AG + GG		1,74	0,41 (0,13 – 1,29)	0,149
		AA vs GG		4,08	0,24 (0,07 – 0,85)	0,021
		AA vs AG		0,45	0,56 (0,17 – 1,86)	0,255
		GG vs AG		3,39	2,36 (0,93 – 5,95)	0,069

MTRR – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

4.3. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

U tablicama od 36 do 42 prikazana je povezanost genotipova i alela varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* sa spolom u skupini osoba s DSPSG+. Nije utvrđena statistički značajna razlika u povezanosti istraživanih genotipova i alela varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* sa spolom u istraživanoj skupini.

Tablica 36. Povezanost varijanti gena *MTHFR* rs1801133 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>MTHFR</i> rs1801133		DSPSG+		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
CC	Genotip	26 (37,68)	25 (38,46)	0,01	0,97 (0,48 – 1,94)	0,926
CT		35 (50,72)	33 (50,77)	0,00	1,00 (0,51 – 1,97)	0,996
TT		8 (11,59)	7 (10,77)	0,02	1,09 (0,37 – 3,19)	0,880
C	Alel	87 (63,04)	83 (63,85)	0,02	0,97 (0,59 – 1,59)	0,892
T		51 (36,96)	47 (36,15)			
Genetički model		CC+CT vs TT		0,02	0,92 (0,31 – 2,70)	0,880
		CC vs CT+TT		0,01	0,97 (0,48 – 1,94)	0,926
		CC vs TT		0,03	0,91 (0,29 – 2,88)	0,873
		CC vs CT		0,00	0,98 (0,47 – 2,03)	0,958
		TT vs CT		0,02	1,08 (0,35 – 3,30)	0,896

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 37. Povezanost varijanti gena *MTHFR* rs1801131 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>MTHFR</i> rs1801131		DSPSG+ N (%)		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
AA	Genotip	40 (57,97)	36 (55,38)	0,09	1,11 (0,56 – 2,20)	0,763
AC		26 (37,68)	29 (44,62)	0,67	0,75 (0,38 – 1,50)	0,415
CC		3 (4,35)	0 (0,00)	0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
A	Alel	106 (76,81)	101 (77,69)	0,03	0,95 (0,54 – 1,68)	0,864
C		32 (23,19)	29 (22,31)			
Genetički model		AA + AC vs. CC		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs AC + CC		0,09	1,11 (0,56 – 2,20)	0,763
		AA vs. CC		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs. AC		0,37	1,24 (0,62 – 2,48)	0,545
		CC vs. AC		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 38. Povezanost varijanti gena *MTRR* rs1801394 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>MTRR</i> rs1801394		DSPSG+ N (%)		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
AA	Genotip	15 (22,06)	17 (26,15)	0,31	0,80 (0,36 – 1,77)	0,581
AG		37 (54,41)	33 (50,77)	0,18	1,16 (0,59 – 2,29)	0,674
GG		16 (23,53)	15 (23,08)	0,00	1,03 (0,46 – 2,29)	0,951
A	Alel	67 (49,26)	67 (51,54)	0,14	0,91 (0,56 – 1,48)	0,711
G		69 (50,74)	63 (48,46)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,00	0,98 (0,44 – 2,18)	0,951
		AA vs AG + GG		0,31	0,80 (0,36 – 1,77)	0,581
		AA vs GG		0,14	0,83 (0,31 – 2,22)	0,707
		AA vs AG		0,31	0,79 (0,34 – 1,82)	0,575
		GG vs AG		0,01	0,95 (0,41 – 2,22)	0,908

MTRR – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 39. Povezanost varijanti gena *DNMT1* rs2228611 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>DNMT1</i> rs2228611		DSPSG+ N (%)		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
AA	Genotip	18 (27,27)	13 (20,63)	0,78	1,44 (0,64 – 3,26)	0,379
AG		38 (57,58)	42 (66,67)	1,13	0,68 (0,33 – 1,39)	0,289
GG		10 (15,15)	8 (12,70)	0,16	1,23 (0,45 – 3,34)	0,688
A	Alel	74 (56,06)	68 (53,97)	0,11	1,09 (0,67 – 1,78)	0,736
G		58 (43,94)	58 (46,03)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,16	0,81 (0,30 – 2,22)	0,688
		AA vs AG + GG		0,78	1,44 (0,64 – 3,26)	0,379
		AA vs GG		0,03	1,11 (0,34 – 3,58)	0,864
		AA vs AG		1,00	1,53 (0,66 – 3,53)	0,319
		GG vs AG		0,38	1,38 (0,49 – 3,86)	0,538

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 40. Povezanost varijanti gena *DNMT3A* rs1550117 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>DNMT3A</i> rs1550117		DSPSG+ N (%)		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
AA	Genotip	0 (0,00)	1 (1,59)	0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG		11 (17,46)	10 (15,87)	0,06	1,12 (0,44 – 2,86)	0,811
GG		52 (82,54)	52 (82,54)	0,00	1,00 (0,40 – 2,51)	1,000
A	Alel	11 (8,73)	12 (9,45)	0,04	0,92 (0,39 – 2,16)	0,842
G		115 (91,27)	115 (90,55)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,00	1,00 (0,40 – 2,51)	1,000
		AA vs AG + GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs AG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		GG vs AG		0,04	0,91 (0,36 – 2,32)	0,842

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 41. Povezanost varijanti gena *DNMT3B* rs1569686 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>DNMT3B</i> rs1569686		DSPSG+ N (%)		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
GG	Genotip	26 (40,00)	24 (36,92)	0,33	1,14 (0,56 – 2,31)	0,719
TG		30 (46,15)	33 (50,77)	0,23	0,83 (0,42 – 1,65)	0,599
TT		9 (13,85)	8 (13,31)	0,07	1,15 (0,41 – 3,18)	0,795
G	Alel	82 (63,08)	81 (62,31)	0,02	1,03 (0,63 – 1,71)	0,898
T		48 (36,92)	49 (37,69)			
Genetički model		GG + TG vs TT		0,07	0,87 (0,31 – 2,43)	0,795
		GG vs TG + TT		0,33	1,14 (0,56 – 2,31)	0,719
		GG vs TT		0,00	0,96 (0,32 – 2,90)	0,947
		GG vs TG		0,21	1,19 (0,57 – 2,51)	0,644
		TT vs TG		0,15	1,24 (0,42 – 3,62)	0,697

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 42. Povezanost varijanti gena *DNMT* rs2424913 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

<i>DNMT3B</i> rs2424913		DSPSG+ N (%)		χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
		Muškarci N (%)	Žene N (%)			
CC	Genotip	19 (30,65)	22 (35,48)	0,33	0,80 (0,38 – 1,70)	0,567
CT		25 (40,32)	27 (43,55)	0,13	0,88 (0,43 – 1,79)	0,716
TT		18 (29,03)	13 (20,97)	1,08	1,54 (0,68 – 3,51)	0,301
C	Alel	63 (50,81)	71 (57,26)	1,04	0,77 (0,47 – 1,27)	0,308
T		61 (49,19)	53 (42,74)			
Genetički model		CC+CT vs TT		1,08	0,65 (0,29 – 1,47)	0,301
		CC vs CT+TT		0,33	0,80 (0,38 – 1,70)	0,567
		CC vs TT		0,97	0,62 (0,24 – 1,60)	0,326
		CC vs CT		0,03	0,93 (0,41 – 2,12)	0,868
		TT vs CT		0,78	1,50 (0,61 – 3,67)	0,379

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

5. RASPRAVA

Osnovni cilj ovog retrospektivnog istraživanja bio je utvrditi povezanost varijanti gena *MTHFR* rs1801133 i rs1801131, *MTRR* rs1801394, *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117, *DNMT3B* rs1569686 i rs2424913 s razvojem PSG-a kod osoba s DS-om, kako pojedinačno tako i u kombinaciji. Ispitivana je distribucija i učestalost genotipova i alela navedenih varijanti gena, kao i povezanost genotipova i alela s predispozicijom za razvoj PSG-a, vrstom PSG-e i spolom ispitanika. U istraživanju su bile uključene dvije skupine ispitanika: prva skupina obuhvaćala je osobe s DS-om i PSG-om (DSPSG+), dok je druga skupina bila kontrolna i uključivala osobe s DS-om bez PSG-e (DSPSG-).

Kod osoba s DS-om postoji značajno veća prevalencija PSG-a u usporedbi s općom populacijom. Iako je poznato da PSG nisu isključivo posljedica trisomije 21, visoka prevalencija tih grešaka kod osoba s DS-om čini ih reprezentativnom skupinom ispitanika za istraživanje etiologije tog poremećaja. Nadalje, važno je istaknuti da su svi ispitanici pripadali bijeloj rasi i zajedničkom geografskom području, što predstavlja dodatnu prednost ovog istraživanja. Etnička ili rasna pripadnost, kao i geografsko područje, mogu značajno utjecati na distribuciju ispitivanih varijanti gena [15, 45, 112, 136, 140, 169, 226]. Corona-Rivera i suradnici (2019) naglašavaju da razlike među etničkim skupinama mogu biti objašnjene prisutnošću određenih genetskih ili okolišnih čimbenika rizika, koji su češći u određenim populacijama [86].

Ovaj rad predstavlja izvorni znanstveni doprinos u istraživanju novih aspekata etiologije PSG-a kod osoba s DS-om. Po prvi put, istražen je pojedinačni doprinos varijanti gena *DNMT*, kao i njihova kombinacija s varijantama gena *MTHFR*, *MTRR*, te njihova povezanost s najčešćim vrstama PSG-a (ASD, VSD i AVSD), dok su rijetke kombinacije PSG-a izostavljene iz analize zbog malog uzorka potrebnog za adekvatnu analizu. Isto tako analizirana je i povezanost varijanti spomenutih gena sa spolom u skupini DSPSG+.

S obzirom na ključnu ulogu navedenih gena u metabolizmu folata i metionina, tijekom embrionalnog razvoja srčanog septuma analizirani geni ističu se kao potencijalni rizični čimbenici za razvoj PSG-a. Naime, navedeni geni neophodni su za sintezu i prijenos metilnih skupina potrebnih za uspostavu i održavanje obrasca metilacije DNK [18]. Također, varijante u ovim genima mogu dovesti do promjena u aktivnosti kodirajućih enzima metabolizma folata i metionina, što može rezultirati hiperhomocisteinemijom. Povezanost hiperhomocisteinemije s promijenjenim obrascem metilacije DNK u ranim fazama embrionalnog razvoja prepoznata je kao čimbenik rizika za razvoj PSG-a [123, 124, 125]. Studije su pokazale da unutar specifičnih tkiva postoje varijacije sekvenci koje mogu utjecati na različiti obrazac metilacije DNK te predstavljati

rizični čimbenik za razvoj nekog stanja ili bolesti. Lokusi gena koji sadrže takve varijante u sekvenci nazivaju se lokusi kvantitativnih svojstava metilacije (engl. *methylation quantitative trait loci*, mQTL) i povezane su s kvantitativnim promjenama u razinama metilacije citozina u CpG dinukleotidima [227]. Odabrane varijante gena, u našem istraživanju, prema bazi mQTL-ova [228] aktivne su tijekom cijelog životnog vijeka, a nalaze se u neposrednoj blizini višestrukih mjesta metilacije DNK [184]. Temeljem svega navedenoga postavljena je hipoteza za ovo istraživanje koja pretpostavlja da su SNP-ovi gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* pojedinačno ili u kombinaciji, rizični čimbenici za razvoj prirođenih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom s obzirom da su neki od njih aktivni tijekom embrionalnog doba.

U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 258 osoba s citogenetički potvrđenom trisomijom kromosoma 21. Prevalencija PSG-a iznosila je 51,94 % (tablica 9) što je u skladu s ranijim istraživanjima koja su provedena u različitim geografskim područjima i među različitim etničkim skupinama [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Septalni defekti su bili dominantna vrsta PSG-a, prisutni u 82,84 % slučajeva u naših ispitanika. U brojnim istraživanjima, septalni defekti su jednoznačno identificirani kao vodeća vrsta PSG-a kod osoba s DS-om [5, 76, 79, 80, 81]. Literaturni podaci ukazuju na manju učestalost složenih vrsta PSG-a kod živorođenih osoba s DS-om što je najvjerojatnije posljedica spontanijih pobačaja kao i poboljšane detekcije složenih PSG-a tijekom prenatalnog razdoblja zbog kojih se roditelji odlučuju na prekid trudnoće [87]. Naime, spektar PSG-a prenatalno značajno se razlikuje od postnatalnog, s većim udjelom dodatnih abnormalnosti kod prenatalnih dijagnoza [229].

Najzastupljenije vrste septalnih defekata u ovom istraživanju bili su ASD (36,57 %), VSD (23,13 %) i AVSD (23,13 %) (tablica 9). Distribucija vrsta septalnih defekata kod osoba s DS-om varira među istraživanjima [76, 80, 81], što može biti posljedica različitih dijagnostičkih metoda, varijabilnosti veličine uzorka, klasifikacijskih razlika te uključivanja prolaznih ili fizioloških PSG-a [29, 84, 85, 86].

Ovim istraživanjem nisu utvrđene statistički značajne razlike u distribuciji vrsta PSG-a prema spolu ispitanika. Iako je spol prepoznat kao jedan od čimbenika rizika za razvoj PSG-a kod osoba s DS-om, rezultati istraživanja nisu jednoznačni (Prilog 1. tablica 2). Meta-analiza ukazuje na to da ženski spol ima značajnu ulogu kao čimbenik rizika za pojavu PSG-a, posebno AVSD-a [83]. Neki autori objašnjavaju ove razlike identificiranjem varijacija u osjetljivosti među spolovima prema različitim mehanizmima koji pridonose pojavi različitih vrsta PSG-a. Na primjer, AVSD je povezan s anomalijama izvanstaničnog matriksa, dok je TOF povezan s anomalijama migracije ektomezenhimalnog tkiva [230]. Dodatno, povećana učestalost pobačaja muških fetusa, posebice onih povezanih s određenim vrstama PSG-a, može biti drugo moguće objašnjenje [83].

5.1. Analiza varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Učestalost genotipova i alela istraživanih varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* bile su u skladu s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovom modelu u obje skupine, osim za varijante gena *DNMT1* rs2228611 u ispitivanoj skupini DSPSG+ ($p = 0,004$) i *MTHFR* rs1801131 u kontrolnoj skupini DSPSG- ($p = 0,004$). Odstupanja u kontrolnoj skupini prije testiranja povezanosti mogu biti posljedica različitih prirodnih čimbenika poput pristranosti odabira, populacijskih stratifikacija i pogrešaka u genotipizaciji. S druge strane, odstupanja u ispitivanoj skupini mogu ukazivati na povezanost testiranih varijanti s ispitivanim stanjima/fenotipom. Važno je napomenuti da ovaj model ima svoja ograničenja, a to je da se primjenjuje samo za velike populacije u genetičkoj ravnoteži bez selektivnog pritiska, odsutnost mutacija i migracija u ili iz populacije, te jednakost vjerojatnosti svake jedinke u populaciji da prenese svoje gene na sljedeću generaciju [231].

U skupini DSPSG+, utvrđena je statistički značajno veća učestalost homozigotnog genotipa *DNMT3B* rs 2424913 TT ($p = 0,018$) (tablica 10) u odnosu na kontrolnu skupinu i europsku populaciju [133]. Izgled za razvoj PSG-a prema dominantnom genetičkom modelu nasljeđivanja (CC + CT vs TT) je i do 2,24 puta veći ($p = 0,019$) (tablica 32). Navedeni rezultati ukazuju da je *DNMT3B* rs2424913 TT genotip mogući čimbenik rizika za razvoj PSG-a kod osoba s DS-om. Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da je u prisutnosti varijante *DNMT3B* rs2424913, ekspresija gena *DNMT3B* promijenjena. Naime, rizični alel -149T uzrokuje 30 % povećanu aktivnost promotora [208, 209] te utječe na mjesto vezivanja miRNA [210]. S obzirom na navedeno, moguće je da povećana ekspresija gena *DNMT* zbog prisutnosti rizičnog alela T mijenja metilaciju DNK gena relevantnih u kardiogenezi i potencijalno pridonosi razvoju PSG-a. Štoviše, ovaj gen može predstavljati dodatni čimbenik rizika za promijenjeni obrazac metilacije gena na kromosomu 21, poput *DSCAM*, *COL6A1*, *COL6A2*, *KCNJ6* i *RCAN1*, koji su povezani s defektima endokardijalnih jastučića kod DSPSG+ osoba, kako se navodi u nedavnim preglednim radovima [89, 106]. Nadalje, rezultati istraživanja na animalnim modelima ukazuju da knockdown *Dnmt3b* uzrokuje smrt miševa zbog srčanih ventrikularnih defekata, dok miševi kojima nedostaju *Dnmt3a* ili *Dnmt3b* pokazuju različite defekte i umiru u različitim fazama razvoja, sugerirajući različite uloge ovih enzima tijekom srčane embriogeneze [232]. Uz to, *Dnmt3b* regulira metilaciju DNK esencijalnih gena srca i sudjeluje u potiskivanju ekspresije fetalnih srčanih gena [20, 233]. Studije su pokazale da *Dnmt3b* kontrolira ekspresiju gena usmjerenih na vezivanje transkripcijskog faktora REST (engl. *repressor element 1 (RE1) silencing transcription factor*) u srčanoj embriogenezi [234]. U slučaju nedostatka *Dnmt3b* unutar endokarda, dolazi do značajnog

povećanja razine hijaluronan sintaze 3 (engl. *hyaluronan synthase 3* – *Has3*), enzima odgovornog za remodeliranje izvanstaničnog matriksa i formiranje zalistaka tijekom srčanog razvoja [20].

U skupini DSPSG+, utvrđena je statistički značajno veća učestalost genotipa *MTHFR* rs1801131 AA (56,7 %) ($p = 0,047$) (tablica 10) u odnosu na kontrolnu skupinu (44,4 %) i europsku populaciju (43,4 %) [133]. Važno je pažljivo tumačiti granično statistički značajnu razliku, imajući u vidu odstupanje od HWE u kontrolnoj skupini DSPSG- ($p = 0,004$), koja može biti posljedica ograničenog broja ispitanika. Stoga je u ovom slučaju proširivanje analize na većem broju ispitanika nužno za donošenje konačnog zaključka. Literaturni podaci ukazuju da možemo naše rezultate interpretirati u kontekstu prethodnih istraživanja koja su utvrdila da normalni AA genotip može predstavljati potencijalni čimbenik rizika za razvoj nesindromskih PSG-a [145, 167].

Učestalosti ostalih analiziranih genotipova i alela istraživanih varijanti gena *MTHFR* rs1801133, *MTRR* rs1801394, *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117 i *DNMT3B* rs1569686 nije se značajno razlikovala između analiziranih skupina. Što se tiče povezanosti polimorfizama *MTHFR* rs1801133 i *MTRR* rs1801394 s rizikom za razvoj PSG-a prethodne studije su prikazale suprotne rezultate ove povezanosti, i u odnosu na naše rezultate, u općoj populaciji i među osobama s DS-om (Prilog 2. tablica 3 i 4; Prilog 3. tablica 5). Ipak, s obzirom na dokaze o smanjenoj aktivnosti enzima povezanoj s ovim varijantama gena, što može rezultirati povećanim razinama homocisteina i utjecati na obrasce metilacije, ovi polimorfizmi ostaju vrijedni kandidati za daljnje istraživanje u kontekstu PSG-a te ih ne bi trebalo zanemariti u budućim studijama. Isto vrijedi i za polimorfizme *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117 koji unatoč nedostatku dokaza o povezanosti s PSG-a kod osoba s DS-om u našem istraživanju, ostaju važni kandidati za buduća istraživanja, s obzirom na njihovu značajnu ulogu tijekom razvoja kardiomiocita. U našoj prethodno objavljenoj studiji utvrđena je statistički značajno veća učestalost *DNMT3B* rs1569686 TT genotipa, kao i utjecaj dominantnog i kodominantnog genetičkog modela istog SNP-a na razvoj PSG kod ispitanika s nesindromskim PSG-om [235]. Funkcionalna uloga ovog polimorfizma još nije jasno definirana, obzirom da se nalazi u promotorskoj regiji gena vjerojatno može modificirati njegovu aktivnost deaktivacijom vezanja faktora transkripcije ili povezivanjem s drugim polimorfizmima, međutim u ovom trenutku nema dovoljno znanstvenih dokaza kojima se to može objasniti [208, 210, 236].

Kombinacije genotipova istraživanih polimorfizama kod osoba s DS-om, s i bez PSG-a, do sada nisu analizirane, stoga je ovo istraživanje prvo takve vrste te nemamo postojeću literaturu za usporedbu dobivenih rezultata. Važno je napomenuti da, unatoč mnogim studijama o povezanosti varijanti gena *MTHFR* i *MTRR* s razvojem sindromskih i nesindromskih PSG-a, samo je manji broj autora analizirao kombinacije genotipova (Prilog 2. tablica 3 i 4; Prilog 3. tablica 5).

U istraživanju koje su proveli Goldmuntz i suradnici (2008), otkriven je smanjeni rizik za razvoj nesindromskih PSG-a kod pojedinaca s *MTHFR* A1298C AC i CC genotipom u usporedbi s AA genotipom [167]. U indijskoj populaciji, Elsayed i suradnici (2014) su dokazali da polimorfizam *MTHFR* C677T povećava rizik od razvoja PSG-a kod osoba s DS-om, posebno kada je prisutan zajedno s polimorfizmom *RFC1* A80G [157].

Istraživanje Brandelize i suradnika (2009) o povezanosti varijanti gena *MTHFR* rs1801133 i rs1801131 s rizikom za rođenje djeteta s DS-om utvrdilo je da polimorfizam *MTHFR* rs1801133 povećava rizik kada je u kombinaciji s *MTHFR* rs1801131 AA genotipom. Rezultati sugeriraju da kombinacija *MTHFR* rs1801133 CT ili TT s *MTHFR* rs1801131 AA genotipom povećava rizik za rađanje djeteta s DS-om do dva puta u odnosu na pojedinačan učinak svakog genotipa, uz kontrolu dobi majke [47].

Rizik za razvoj PSG u prisutnosti kombinacije genotipa *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTHFR* rs1801133 CT (tablica 11) kao i *MTHFR* rs1801131 AA (tablica 12) veći je i do 4,53 puta ($p = 0,003$). Također, kombinacija genotipova *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTRR* rs1801394 AG doprinosi 2,82 puta većem izgledu za razvoj PSG-a ($p = 0,025$) (tablica 13). Obzirom da je *MTHFR* gen ključan gen u sintezi aktivnog oblika folata koji prenosi metilne skupine te da je funkcionalni polimorfizam lociran u katalitičkoj domeni proteina čime se samanjuje mogućnost vezanja supstrata [132] a time i funkcija enzima, očito je da se prijenos metilnih skupina usljed prisutnosti SNP-a mijenja što može biti ključno za kardiogenezu. Nadalje u prisutnosti SNP-a u *MTRR* genu dodatno se narušava prijenos metilnih skupina, ali i mogućnost remetilacije homocisteina što mijenja njegovu koncentraciju i prema literaturnim navodima može utjecati na razvoj PSG-a [161, 140, 237]. Dodatno, u kombinaciji s genotipom *DNMT3B* rs2424913 TT povećava se rizik za razvoj PSG što se može potvrditi istraživanjima na animalnim modelima koji ukazuju na promjenu obrazca *de novo* metilacije tijekom embionalnog razvoja srčane pregrade [232]. Naši rezultati ukazuju na već poznatu pretpostavku da je za razvoj PSG-a vjerojatno potreban doprinos više od jednog gena i da prekomjerna ekspresija gena na kromosomu 21 djeluje u kombinaciji s drugim specifičnim mutacijama ili polimorfizmima, pojačavajući njihov učinak [238].

U našem istraživanju nisu utvrđene određene kombinacije genotipova polimorfizama, kao što su *MTHFR* rs1801133 i rs1801131 (CT/CC, TT/AC i TT/CC), koje su interesantne jer su češće prisutne u spontano pobačenih plodova, a gotovo nikada u živorođenih [239, 240]. Postavljena je hipoteza o stabilnosti *MTHFR* enzima koji ovisi o prisutnosti određenog alela na poziciji 677 i 1298 u genu *MTHFR*, što za posljedicu ima različitu aminokiselinu u katalitičkoj i regulatornoj domeni enzima [241]. Destabilizaciju enzima uzrokuje promijenjena konformacija polipeptida uključujući

kretanje polipeptidnih domena koje su inducirane varijantama u genu. Martínez-Frías i suradnici pokazali su da se pod utjecajem interakcije različitih genotipova mijenja razina ukupnog homocisteina u majki koje su rodile dijete s DS-om te temeljem toga određene kombinacije genotipova povezuju se s rizikom za trisomiju 21 [242]. Spomenute studije zaključuju da nestabilan enzim može doprinijeti promjenama u razini homocisteina te preranoj smrtnosti embrija, čime se može objasniti i manja pojavnost rijetkih kombinacija genotipova u živorođenih. S obzirom na to da je u ovom radu po prvi puta ispitana kombinacija genotipova koja uključuje i *DNMT* gene kod osoba s DS-om, možemo samo spekulirati o razlozima izostanka nekih kombinacija genotipova koji također mogu biti povezani s preživljavanjem embrija, u ovisnosti o broju SNP-ova kod pojedinaca, što ima određeni utjecaj na ciklus folata i metionina.

5.2. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s vrstom prirodene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom

Kao što smo istaknuli u uvodnom dijelu, varijante gena mogu predstavljati čimbenike rizika za pojavu određenih vrsta PSG-a.

Utvrđena je statistički značajna povezanost genotipa *DNMT3B* rs2424913 TT ($p = 0,028$) kao i recesivnog genetičkog modela CC vs CT + TT ($p = 0,028$) te samog alela T ($p = 0,018$) s ASD-om (tablica 33). S obzirom da smo po prvi puta u ovom radu analizirali povezanost varijati *DNMT3B* gena sa srčanim greškama u osoba s DS-om nemamo literaturne navode za usporedbu. Međutim, nastavno na sve navedeno možemo pretpostaviti da promjene u metilaciji promotora, uzrokovane prisutnošću rizičnog alela *DNMT3B* rs2424913 T, mogu doprinijeti promjenjenoj ekspresiji ključnih gena u procesu kardiogeneze tijekom razvoja pretklijetki.

Lei i suradnici (2017) su utvrdili da su spol i *DNMT1* rs16999358 neovisni čimbenici rizika za kompletnu TGA, dok je genotip *DNMT1* rs16999593 CT genotip mogući protektivni čimbenik [211]. Lyu i suradnici (2020) su utvrdili su povezanost *DNMT3A* rs11892646 s razvojem konotrunkalnih srčanih defekata [212].

Prema literaturi kod osoba s nesindromskim PSG-ma, *MTHFR* rs1801133 TT genotip povećao je rizik za TOF [147, 243], KSD [164, 244], PDA [245], stenozu plućne valvule, sindromom hipoplastičnog lijevog srca, koarktaciju aorte, stenozu aortne valvule ili subaortalnu stenozu [137]. Noori i suradnici (2017) utvrdili su da *MTHFR* rs1801133 TT genotip predstavlja potencijalni čimbenik rizika za fenotip VSD u iranskoj populaciji (OR = 10) [246]. Kod osoba s PDA zabilježen je veći udio *MTHFR* rs1801131 CC i AA genotipa i odnosu na osobe bez PDA [247].

Rezultati ovog istraživanja utvrdili su potencijalni rizik *MTHFR* rs1801133 CT genotipa za razvoj ASD u DS ($p = 0,040$) (tablica 34). Elsayed i suradnici (2014), uspoređujući majke djece s DS-om s kontrolama, također su primijetili značajno višu učestalost CT genotipa u majki djece s DS-om i AV kanalom; nadalje, 80 % majki svih pacijenata s AV kanalom imalo je CT genotip, no statistički je značajan bio samo u majki djece s DS-om [157]. U istraživanju Ganguly i suradnika (2021), uočena je značajno veća učestalost alela T i CT genotipa polimorfizma *MTHFR* rs1801133 u skupini osoba s DS-AVSD-om. Autori pretpostavljaju da polimorfizmi gena metabolizma folata i metionina, koji reguliraju globalnu metilaciju DNK gena važnih za razvoj embrionalnog srčanog septuma, vjerojatno ometaju staničnu proliferaciju tijekom razvoja. Ovaj učinak vjerojatno se pojačava u kontekstu trisomije 21, gdje geni na kromosomu 21 s promijenjenom dozom RNK i proteina mogu utjecati na različite molekularne putove putem kompleksnih interakcija. Očekuje se da će zbunjujući učinci interakcija između različitih genetičkih modifikatora rezultirati različitim razinama promijenjene ekspresije gena koji su uključeni u razvoj srčanog septuma, što može dovesti do raznolikih manifestacija AVSD-a u kontekstu trisomije 21 [156].

MTRR rs1801394 G alel ($p = 0,020$), GG genotip ($p = 0,023$), dominantni AA + AG vs GG i kodominantni genetički model AA vs GG ($p = 0,021$) (tablica 35) mogući su čimbenici rizika za razvoj AVSD-a kod osoba s DS-om. Rezultati ranijih istraživanja provedenih na roditeljima djece s VSD-om, kao i na osobama s nesindromskim VSD-om, pokazuju da genotip *MTRR* rs1801394 GG predstavlja devet puta veći rizik za razvoj VSD-a, što je vjerojatno povezano s povećanom razinom homocisteina kao posljedicom nedovoljne remetilacije u metionin [237, 248]. Istraživanja na animalnim modelima potvrđuju učinke visokih razina homocisteina na razvoj subarterijalnog defekta ventrikularnog septuma [249].

5.3. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u povezanosti istraživanih genotipova i alela varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* sa spolom u DSPSG+ skupini. Većina pregledanih istraživanja nije komentirala razlike u učestalosti genotipova i alela po spolu (Prilog 2. tablica 3 i 4; Prilog 3. tablica 5). Rozen i suradnici (1999) izvjestili su o nižem udjelu *MTHFR* rs1801133 TT genotipa među ženskom novorođenčadi [250]. Također, manji udio homozigota rs1801133 TT genotipa kod žena (28,6 %) u odnosu na muškarace (71,4 %) prijavljen je i u egipatskoj populaciji [144]. Smanjena aktivnost *Mthfr* u ženki miševa dovodi do rađanja većeg broja potomaka sa srčanim defektima, pri čemu je najveći udio VSD-a [251]. U istraživanju

McBride i suradnika (2004) nije utvrđena povezanost varijanti gena *MTHFR* rs1801133 i rs1801131 s nesindromskim PSG-ma, s obzirom na spol ispitanika [252]. Nadalje, u jednom od istraživanja je primijećeno da je varijanta *MTHFR* rs1801133 TT genotip češća u muškaraca s ASD-om, dok su žene imale veću vjerojatnost za razvoj PDA. Autori ističu da zbog većeg broja ženskih ispitanika u istraživanju, rezultate treba promatrati s oprezom [245]. Statistički značajne razlike u genotipskim i alelnim učestalostima među spolovima nisu utvrđene, ali je primijećen rodno specifični interaktivni učinak varijanti gena *MTHFR* rs1801133 i *MTRR* rs1801394 na vrijednosti lipograma kod osoba s prekomjernom tjelesnom težinom [253].

Istraživanja o povezanosti varijanti gena *DNMT* i spola mogu se promatrati u odnosu na druga stanja i bolesti kardiovaskularne etiologije, kao i druge varijante gena. Rezultati ranijeg istraživanja pokazuju povezanost varijante *DNMT1* rs2228611 i esencijalne hipertenzije kod muškaraca. Viša stopa esencijalne hipertenzije kod muškaraca, ranija dob pojave bolesti te niža stopa kontrole bolesti neka su od objašnjenja dobivenih rezultata [216]. Coppedè i suradnici (2019) utvrdili su značajno više razine homocisteina u muškaraca, dok su razine vitamina B12 bile više u žena. Međutim, nije primijećena spolna razlika u razinama metilacije *DNMT1* [18]. Varijanta gena *DNMT1* rs11085721 povezana je s rizikom za razvoj srčane autonomne neuropatije kod žena s dijabetesom tipa 1 [254]. Spolni dimorfizam može biti posljedica razlika u epigenetskom statusu ključnih gena izazvanih spolnim hormonima [255], kao i veće aktivnosti *Dnmt1* kod mužjaka [256].

Nadalje, utvrđeno je da su varijante gena *DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B* povezane s različitim etiologijama kao što su muška neplodnost [257], spontani pobačaj [202], prijevremeni porod [258], te shizofrenija kod muškaraca [210, 259].

Rezultati ovog retrospektivnog istraživanja doprinose boljem razumijevanju etiologije PSG kod osoba s DS-om. Po prvi put, istražen je pojedinačni doprinos varijanti gena *DNMT*, kao i njihova kombinacija s varijantama gena *MTHFR*, *MTRR*, te njihova povezanost s najčešćim vrstama PSG-a. Zbog vrlo visoke učestalosti PSG-a kod osoba s DS-om, one predstavljaju izvrsnu skupinu ispitanika za istraživanje etiologije PSG-a. Nadalje, važno je istaknuti da su svi ispitanici pripadali bijeloj rasi i zajedničkom geografskom području, što predstavlja dodatnu prednost ovog istraživanja. Ključni nedostatak našeg istraživanja, koji je istaknut i u brojnim ranijim istraživanjima, jest mali uzorak ispitanika. Ovo postaje posebno značajno kada se podaci stratificiraju prema različitim vrstama PSG-a. Uključivanje osoba s DS-om predstavlja izazov zbog otpora roditelja/skrbnika prema sudjelovanju u istraživanju. S obzirom na kompleksnost kliničke slike osoba s DS-om i kontinuiranu potrebu za različitim oblicima tretmana, sudjelovanje u istraživanju dodatno opterećuje osobe s DS-om i njihove roditelje/skrbnike.

Buduća istraživanja bi trebala obuhvatiti veći broj ispitanika i razmotriti različite okolišne čimbenike, uključujući socioekonomski status, rizik od malnutricije i nedovoljan unos određenih nutrijenata. Također bi trebala uzeti u obzir biokemijske parametre poput razine homocisteina, vitamina B12, S-adenozilhomocisteina i metionina, kao i bolesti i stanja roditelja i djeteta.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja, mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. prevalencija PSG-a kod osoba s DS-om iznosila je 51,94 %. U 82,84 % slučajeva utvrđen je septalni defekt, pri čemu je najčešća vrsta bila ASD, prisutna u 36,57 % slučajeva,
2. genotip *DNMT3B* rs2424913 TT ($p = 0,018$), kao i dominantni (CC + CT vs TT) (OR = 2,24; $p = 0,019$) i kodominantni genetički modeli (TT vs CT) (OR = 0,38; $p = 0,008$), mogući su potencijalni čimbenici rizika za razvoj PSG-a kod osoba s DS-om,
3. izgled za razvoj PSG-a kod osoba s DS-om je 4 puta veći u prisutnosti kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTHFR* rs1801133 CT ($p = 0,003$) te *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTHFR* rs1801131 AA ($p = 0,003$),
4. rizik za razvoj PSG-a kod osoba s DS-om u prisutnosti kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 TT i *MTRR* rs1801394 AG veći je za 2,82 puta ($p = 0,025$),
5. *DNMT3B* TT genotip (OR = 2,56; $p = 0,028$) te T alel (OR = 0,53; $p = 0,018$) mogući su čimbenici rizika za ASD,
6. izgled za razvoj ASD-a u prisutnosti *MTHFR* rs1801133 CT genotipa veći je za 2,13 puta ($p = 0,040$),
7. *MTRR* rs1801394 GG genotip (OR = 2,77; $p = 0,023$) te alel G (OR = 0,50; $p = 0,020$) kao i dominantni (AA + AG vs GG) (OR = 0,36; $p = 0,023$) te kodominantni genetički model (AA + AG) (OR = 0,24; $p = 0,021$) mogući su rizični čimbenici za razvoj AVSD-a u osoba s DS-om,
8. nije utvrđena povezanost ispitivanih varijanti gena *MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131, *MTRR* rs1801394, *DNMT1* rs2228611, *DNMT3A* rs1550117, *DNMT3B* rs15696696 i rs2424913 sa spolom kod osoba s DSPSG+.

7. LITERATURA

1. Dobosz A, Bik-Multanowski M. Long-term trends in the prevalence of congenital heart defects in patients with Down syndrome in southern Poland. *Dev Period Med* 2019;23:184-189.
2. Tomac V, Pušeljić S, Kos M, Dorner S, Pavišić Kezan R, Wagner J. Epidemiološka, citogenetička i klinička obilježja djece sa sindromom Down u području Istočne Hrvatske – petnaestogodišnje postnatalno iskustvo. *Paediatrica Croatica* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 25];65(2):[67-73.]. Available from: <https://hrcak.srce.hr/en/clanak/378591#>
3. Taura MG, Alshahrani AM, Alqahtani DO. Prevalence of congenital heart disease among patients with down syndrome in Southwestern Saudi Arabia. *Ann Afr Med* 2021;20:265-269.
4. Asim A, Agarwal S, Dean DD. Maternal Risk Factors Triggering Congenital Heart Defects in Down Syndrome: A Case-Control Study. *Pediatr Rep* 2022;14:99-105.
5. Uludağ Alkaya D, Öztürk B, Yüksel Ülker A i sur. Congenital Heart Defects and Outcome in a Large Cohort of Down Syndrome: A Single-Center Experience from Turkey. *Turk Arch Pediatr* 2023;58:473-479.
6. de Groot-van der Mooren MD, Scheerman BC, Rammeloo LAJ i sur. Neonatal mortality and morbidity in Down syndrome in the time of prenatal aneuploidy testing: a retrospective cohort study. *Eur J Pediatr* 2023;182:319-328.
7. Mai CT, Isenburg JL, Canfield MA i sur. National population-based estimates for major birth defects, 2010–2014. *Birth Defects Res* 2019;111:1420–35.
8. Ackerman C, Locke AE, Feingold E i sur. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down-syndrome-associated atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 2012;91:646-59.
9. Vecoli C, Pulignani S, Andreassi MG. Genetic and Epigenetic Mechanisms Linking Air Pollution and Congenital Heart Disease. *J Cardiovasc Dev Dis* 2016;3:32.
10. Zhang TN, Wu QJ, Liu YS i sur. Environmental Risk Factors and Congenital Heart Disease: An Umbrella Review of 165 Systematic Reviews and Meta-Analyses With More Than 120 Million Participants. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:640729.
11. Linglart L, Bonnet D. Epigenetics and Congenital Heart Diseases. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2022;9:185.
12. Esmail NN, Ashaat EA, Al-Ettribi GA, Fayez, A, Alsaiedi SA, El Ruby MO. Association between MTHFR C677T variant and risk for congenital heart defects in Egyptian children:

- a case–control study including meta-analysis based on 147 cases and 143 controls. *Egypt J Med Hum Genet* 2023;24:1-7.
13. Cao J, Wu Q, Huang Y, Wang L, Su Z, Ye H. The role of DNA methylation in syndromic and non-syndromic congenital heart disease. *Clin Epigenetics* 2021;13:93.
 14. Wondemagegn AT, Afework M. The association between folic acid supplementation and congenital heart defects: Systematic review and meta-analysis. *SAGE Open Med* 2022;10:20503121221081069.
 15. Raina JK, Panjaliya RK, Dogra V, Sharma S, Anupriya, Kumar P. "Association of MTHFR and MS/MTR gene polymorphisms with congenital heart defects in North Indian population (Jammu and Kashmir): a case-control study encompassing meta-analysis and trial sequential analysis". *BMC Pediatr* 2022;22:223.
 16. Mamasoula C, Prentice RR, Pierscionek T i sur. Association between C677T polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase and congenital heart disease: meta-analysis of 7697 cases and 13,125 controls. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6:347-53.
 17. Vraneković J, Slivšek G, Majstorović D. Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase gene and congenital heart defects in Down syndrome. *Genet Appl* 2020;4:12–17.
 18. Coppedè F, Stoccoro A, Tannorella P, Gallo R, Nicolì V, Migliore L. Association of Polymorphisms in Genes Involved in One-Carbon Metabolism with MTHFR Methylation Levels. *Int J Mol Sci* 2019;20:3754.
 19. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28:1057-68.
 20. Chamberlain AA, Lin M, Lister RL i sur. DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *J Am Heart Assoc* 2014;3:000976.
 21. Jarrell DK, Lennon ML, Jacot JG. Epigenetics and Mechanobiology in Heart Development and Congenital Heart Disease. *Diseases* 2019;7:52.
 22. Dobosz A, Grabowska A, Bik-Multanowski M. Hypermethylation of NRG1 gene correlates with the presence of heart defects in Down's syndrome. *J Genet* 2019;98:110.
 23. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM® [Internet]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) [cited 2024 May 26]. Available from: <https://omim.org/https://omim.org/>
 24. Vlachadis N, Papadopoulou T, Vrachnis D, Manolakos E, Loukas N, Christopoulos P. Incidence and Types of Chromosomal Abnormalities in First Trimester Spontaneous Miscarriages: a Greek Single-Center Prospective Study. *Maedica (Bucur)* 2023;18:35-41.

25. Lanzoni M, Kinsner-Ovaskainen A, Morris J, Martin S. EUROCAT - Surveillance of congenital anomalies in Europe: epidemiology of Down syndrome 1990 – 2014. Luxemburg: Publications Office of the European Union [Internet]. 2019 Mar [cited 2024 May 26]. Available from:
<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC115824>
26. Antonarakis SE, Skotko BG, Rafii MS i sur. Down syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:9.
27. Benjak T, Ivanić M, Mijić M i sur. Izvješće o osobama s invaliditetom u Republici Hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo služba za javno zdravstvo [Internet] 2023 Sep [cited 2024 May 26]. Available from:
https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2023/09/Izvjesce_o_osobama_s_invaliditetom_2023-1.pdf
28. Kovaleva NV. Gender Affects Clinical Suspicion of Down Syndrome [Internet] 2011 Aug [cited 2024 May 26]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/17999>
29. Haider A, Khan S, Tafweez R, Yaqoob M. Gender and its association with cardiac defects in down syndrome population at Children Hospital & Institute of Child Health, Lahore, Pakistan. *Pak J Med Sci* 2024;40:371-375.
30. Chandra N, Cyril C, Lakshminarayana P i sur. Cytogenetic evaluation of Down Syndrome:a review of 1020 referral cases. *Ind J Hum Genet* 2010;10:87–93.
31. Zhu JL, Hasle H, Correa A i sur. Survival among people with Down syndrome: a nationwide population-based study in Denmark. *Genet Med* 2013;15:64-9.
32. Landes SD, Stevens JD, Turk MA. Cause of death in adults with Down syndrome in the United States. *Disabil Health J* 2020;13:100947.
33. Plaiasu V. Down Syndrome - Genetics and Cardiogenetics. *Maedica (Bucur)* 2017;12:208-213.
34. Vraneković J, Božović IB, Grubić Z i sur. Down syndrome: parental origin, recombination, and maternal age. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16:70-3.
35. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. Down syndrome: an insight of the disease. *J Biomed Sci* 2015;22:41.
36. Sherman SL, Allen EG, Bean LJH. Maternal age and oocyte aneuploidy: lessons learned from trisomy 21.U: Schlegel P, Fauser B, Carrell D, Racowsky C, ur. Biennial review of infertility. New York: Springer, 2013; str. 69–85.

37. 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.
38. Hunter JE, Allen EG, Shin M i sur. The association of low socioeconomic status and the risk of having a child with Down syndrome: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet Med* 2013;15:698-705.
39. Keen C, Hunter JE, Allen EG, Rocheleau C, Waters M, Sherman SL. The association between maternal occupation and down syndrome: A report from the national Down syndrome project. *Int J Hyg Environ Health* 2020;223:207-213.
40. Hildebrand E, Källén B, Josefsson A, Gottvall T, Blomberg M. Maternal obesity and risk of Down syndrome in the offspring. *Prenat Diagn* 2014;34:310-5.
41. Shalaby HMA. A study of new potential risk factors for Down syndrome in Upper Egypt. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2011;12:15-19.
42. Ray A, Hong CS, Feingold E i sur. Maternal Telomere Length and Risk of Down Syndrome: Epidemiological Impact of Smokeless Chewing Tobacco and Oral Contraceptive on Segregation of Chromosome 21. *Public Health Genomics* 2016;19:11-8.
43. Coppedè F. Risk factors for Down syndrome. *Arch Toxicol* 2016;90:2917-2929.
44. Coppedè F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutat Res* 2009;682:54-70.
45. Coppedè F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet* 2015;6:223.
46. 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.
47. Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 2009;149A:2080-7.
48. Božović IB, Stanković A, Živković M, Vraneković J, Kapović M, Brajenović-Milić B. Altered LINE-1 Methylation in Mothers of Children with Down Syndrome. *PLoS One* 2015;27;10:0127423.
49. Miljanović O, Teofilov S, Anđelić M, Magić Z, Cikota-Aleksić B. Maternal MTHFR 677C>T, 1298A>C gene polymorphisms and risk of offspring aneuploidy. *Prenat Diagn* 2022;42:1190-1200.

50. Ginani CTA, da Luz JRD, de Medeiros KS, Sarmiento ACA, Coppedè F, das Graças Almeida M. Association of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene with maternal risk for Down syndrome: A meta-analysis of case-control studies. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2023;792:108470.
51. Liu Y, Chen S, Zühlke L i sur. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol* 2019;48:455-463.
52. Reamon-Buettner SM, Spanel-Borowski K, Borlak J. Bridging the gap between anatomy and molecular genetics for an improved understanding of congenital heart disease. *Ann Anat* 2006;188:213-20.
53. Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1141-8.
54. van der Linde D, Konings EE, Slager MA i sur. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2241-7.
55. Pugnali F, Felici A, Corno AF, Marino B, Versacci P, Putotto C. Gender differences in congenital heart defects: a narrative review. *Transl Pediatr* 2023;12:1753-1764.
56. Yoo BW. Epidemiology of Congenital Heart Disease with Emphasis on Sex-Related Aspects. *Adv Exp Med Biol* 2018;1065:49-59.
57. Oyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PK, Melbye M. National time trends in congenital heart defects, Denmark, 1977-2005. *Am Heart J* 2009;157:467-473.e1.
58. Su Z, Zou Z, Hay SI, Liu Y i sur. Global, regional, and national time trends in mortality for congenital heart disease, 1990-2019: An age-period-cohort analysis for the Global Burden of Disease 2019 study. *EClinicalMedicine* 2022;43:101249.
59. Wu W, He J, Shao X. Incidence and mortality trend of congenital heart disease at the global, regional, and national level, 1990-2017. *Medicine Balt* 2020;99:20593.
60. Digilio MC, Marino B. What Is New in Genetics of Congenital Heart Defects? *Front Pediatr* 2016;4:120.
61. Rojnić-Putarek N, Malčić I. Patogenetički mehanizmi nastanka prirođenih srčanih grešaka. U: Malčić I i sur, ur. *Pedijatrijska kardiologija – odabrana poglavlja*. Zagreb: Medicinska naklada, 2001;17-29.
62. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD i sur. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol* 2011;32:1147-57.

63. Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *Eur J Med Genet* 2014;57:402-13.
64. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H i sur. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature* 2013;498:220-3.
65. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK i sur. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2018;138:653-711.
66. Wu L, Li N, Liu Y. Association Between Maternal Factors and Risk of Congenital Heart Disease in Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Matern Child Health J* 2023;27:29-48.
67. Kalisch-Smith JI, Ved N, Sparrow DB. Environmental Risk Factors for Congenital Heart Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020;12:a037234.
68. Zhang B, Liang S, Zhao J i sur. Maternal exposure to air pollutant PM2.5 and PM10 during pregnancy and risk of congenital heart defects. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2016;26:422-7.
69. Caton AR. Exploring the seasonality of birth defects in the New York State Congenital Malformations Registry. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012;94:424-37.
70. Mao B, Qiu J, Zhao N i sur. Maternal folic acid supplementation and dietary folate intake and congenital heart defects. *PLoS One* 2017;12:e0187996.
71. Feng Y, Wang S, Zhao L, Yu D, Hu L, Mo X. Maternal reproductive history and the risk of congenital heart defects in offspring: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Cardiol* 2015;36:253-63.
72. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res* 2017;120:923-940.
73. Ferencz C, Rubin JD, Loffredo CA, Magee CA, ur. Epidemiology of congenital heart disease. The Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989. New York: Futura Publishing Company, Mount Kisco; 1995.
74. Clark EB. Pathogenetic mechanisms of congenital cardiovascular malformations revisited. *Semin Perinatol* 1996;20:465-72.
75. Lubinsky MS. Sir A. E. Garrod, congenital heart disease in Down syndrome, and the doctrine of fetal endocarditis. *Am J Med Genet* 1991;40:27-30.
76. Santoro SL, Steffensen EH. Congenital heart disease in Down syndrome—A review of temporal changes. *J Congenit Heart Dis* 2021;5:1-14.

77. Mughal A R, Khalid Z R, Safdar B, Mughal S. Spectrum of congenital heart disease in Down syndrome at Faisalabad institute of cardiology: A retrospective study. *Professional Med J* 2020; 27:660-666.
78. Narayanan DL, Yesodharan D, Kappanayil M i sur. Cardiac spectrum, cytogenetic analysis and thyroid profile of 418 children with Down syndrome from South India: A Cross-sectional Study 2013. *Indian J Pediatr* 2014;81:547-551.
79. Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet Med* 2008;10:173-80.
80. Pfitzer C, Helm PC, Rosenthal LM, Berger F, Bauer UMM, Schmitt KR. Dynamics in prevalence of Down syndrome in children with congenital heart disease. *Eur J Pediatr* 2018;177:107-115.
81. Benhaourech S, Drighil A, Hammiri AE. Congenital heart disease and Down syndrome: various aspects of a confirmed association. *Cardiovasc J Afr* 2016;27:287-290.
82. Kim MA, Lee YS, Yee NH, Choi JS, Choi JY, Seo K. Prevalence of congenital heart defects associated with Down syndrome in Korea. *J Korean Med Sci* 2014;29:1544-9.
83. Diogenes TCP, Mourato FA, de Lima Filho JL, Mattos SDS. Gender differences in the prevalence of congenital heart disease in Down's syndrome: a brief meta-analysis. *BMC Med Genet* 2017;18:111.
84. Somasundaram A, Ramkumar P. Study on Congenital Cardiac Defects of Down Syndrome Children. *J Pediat Infants* 2018;1:07-10.
85. Muntha A, Moges T. Congenital Cardiovascular Anomalies among Cases of Down Syndrome: A Hospital Based Review of Cases in TikurAnbessa Specialized Hospital, Ethiopia. *Ethiop J Health Sci* 2019;29:165-174.
86. Corona-Rivera JR, Nieto-García R, Gutiérrez-Chávez AS i sur. Maternal risk factors for congenital heart defects in infants with Down syndrome from Western Mexico. *Am J Med Genet A* 2019;179:1857-1865.
87. Bergström S, Carr H, Petersson G i sur. Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome. *Pediatrics* 2016;138:e20160123.
88. Versacci P, Di Carlo D, Digilio MC, Marino B. Cardiovascular disease in Down syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2018;30:616-622.
89. Zhang H, Liu L, Tian J. Molecular mechanisms of congenital heart disease in down syndrome. *Genes Dis* 2019;6:372-377.

90. Takano T, Akagi M, Takaki H i sur. Sex differences in congenital heart disease in Down syndrome: study data from medical records and questionnaires in a region of Japan. *BMJ Paediatr Open* 2019;3:e000414.
91. Santoro M, Coi A, Spadoni I, Bianchi F, Pierini A. Sex differences for major congenital heart defects in Down Syndrome: A population based study. *Eur J Med Genet* 2018;61:546-550.
92. Rehman Y, Wazir HD, Akbar A i sur. Congenital Heart Disease and Its Association in Children With Down Syndrome. *Cureus* 2022;14:e29176.
93. El-Gilany AH, Yahia S, Wahba Y. Prevalence of congenital heart diseases in children with Down syndrome in Mansoura, Egypt: a retrospective descriptive study. *Ann Saudi Med* 2017;37:386-392.
94. Chéhab G, Chokor I, Fakhouri H, Hage G, Saliba Z, El-Rassi I. Cardiopathie congénitale, âge maternel et consanguinité parentale chez les enfants avec syndrome de Down [Congenital heart disease, maternal age and parental consanguinity in children with Down's syndrome]. *J Med Liban* 2007;55:133-7.
95. Mokhtar MM, Abdel-Fattah M. Major birth defects among infants with Down syndrome in Alexandria, Egypt (1995-2000): trends and risk factors. *East Mediterr Health J* 2001;7:441-51.
96. Bean LJ, Allen EG, Tinker SW i sur. Lack of maternal folic acid supplementation is associated with heart defects in Down syndrome: a report from the National Down Syndrome Project. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:885-93.
97. De-Regil LM, Fernández-Gaxiola AC, Dowswell T, Peña-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;10:CD007950.
98. Csáky-Szunyogh M, Vereczkey A, Kósa Z, Gerencsér B, Czeizel AE. Risk and protective factors in the origin of conotruncal defects of heart--a population-based case-control study. *Am J Med Genet A* 2013;161A:2444-52.
99. Verkleij-Hagoort AC, de Vries JH, Stegers MP, Lindemans J, Ursem NT, Steegers-Theunissen RP. Validation of the assessment of folate and vitamin B12 intake in women of reproductive age: the method of triads. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:610-5.
100. Malik RA, Lone MR, Ahmed A, Koul KA, Malla RR. Maternal hyperhomocysteinemia and congenital heart defects: A prospective case control study in Indian population. *Indian Heart J* 2017;69:17-19.

101. Soheilrad Z. Folic acid intake in prevention of congenital heart defects: A mini evidence review. *Clin Nutr ESPEN* 2020;38:277-279.
102. 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.
103. Sinet PM, Théophile D, Rahmani Z i sur. Mapping of the Down syndrome phenotype on chromosome 21 at the molecular level. *Biomed Pharmacother* 1994;48:247-52.
104. Korenberg JR, Bradley C, Disteché CM. Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet* 1992;50:294-302.
105. Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature* 2014;508:345-50.
106. Asim A, Agarwal S. Congenital heart defects among Down's syndrome cases: an updated review from basic research to an emerging diagnostics technology and genetic counselling. *J Genet* 2021;100:45.
107. Eskes TK. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;124:130-3.
108. Babić Božović I, Vraneković J. Folati i folna kiselina: dosadašnje spoznaje. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2014 Jun [cited 2024 May 26];50(2):[169-175.]. Available from: <https://hrcak.srce.hr/121864>
109. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014;533:11-20.
110. 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.
111. Martínez-Frías 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:1477-82.
112. Wang B, Liu M, Yan W i sur. Association of SNPs in genes involved in folate metabolism with the risk of congenital heart disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:1768-77.

113. Gagliardi M, Strazzullo M, Matarazzo MR. DNMT3B Functions: Novel Insights From Human Disease. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:140.
114. Zheng Y, Cantley LC. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *J Exp Med* 2019;216:253-266.
115. National Library of Medicine (US); [cited 2024 May 26]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
116. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC i sur. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-33.
117. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* 2009;578:3-22.
118. Antonarakis SE. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat Rev Genet* 2017;18:147-163.
119. Akhlaghipour I, Bina AR, Mogharrabi MR i sur. Single-nucleotide polymorphisms as important risk factors of diabetes among Middle East population *Hum Genomics* 2022;16:11.
120. Christensen KE, Zada YF, Rohlicek CV i sur. Risk of congenital heart defects is influenced by genetic variation in folate metabolism. *Cardiol Young* 2013;23:89-98.
121. Boot MJ, Steegers-Theunissen RP, Poelmann RE, Van Iperen L, Lindemans J, Gittenberger-de Groot AC. Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. *Dev Dyn* 2003;227:301-8.
122. Tang LS, Wlodarczyk BJ, Santillano DR, Miranda RC, Finnell RH. Developmental consequences of abnormal folate transport during murine heart morphogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:449-58.
123. 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;10:111-3.
124. Gong M, Dong W, He T i sur. MTHFR 677C>T polymorphism increases the male infertility risk: a meta-analysis involving 26 studies. *PLoS One* 2015;10:e0121147.
125. Zhang Y, He X, Xiong X i sur. The association between maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and birth defects and adverse pregnancy outcomes. *Prenat Diagn* 2019;39:3-9.
126. Zhang R, Huo C, Wang X, Dang B, Mu Y, Wang Y. Two Common MTHFR Gene Polymorphisms (C677T and A1298C) and Fetal Congenital Heart Disease Risk: An

- Updated Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2018;45:2483-2496.
127. Meneses-Sanchez P, Garcia-Hernandez SC, Porchia LM i sur. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer susceptibility among Latinos: a meta-analysis. *Breast Cancer* 2019;26:602-611.
 128. Song Y, Li B, Wang C, Wang P, Gao X, Liu G. Association between 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Gene Polymorphism and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2016;25:679-87.
 129. Yuan Y, Shao W, Li Y. Associations between C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int* 2017;37:557-569.
 130. Stoccoro A, Tannorella P, Salluzzo MG i sur. The Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Risk for Late-Onset Alzheimer's disease: Further Evidence in an Italian Multicenter Study. *J Alzheimers Dis* 2017;56:1451-1457.
 131. Liu L, Zhang L, Guo L, Yu Q, Li H, Teng J, Xie A. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms may contribute to the risk of Parkinson's disease: A meta-analysis of 19 studies. *Neurosci Lett* 2018;662:339-345.
 132. Raghubeer S, Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients* 2021;13:4562.
 133. SNPedia [Internet]. [cited 2024 May 26].
Available from: <https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>
 134. Pereira AC, Xavier-Neto J, Mesquita SM, Mota GF, Lopes AA, Krieger JE. Lack of evidence of association between MTHFR C677T polymorphism and congenital heart disease in a TDT study design. *Int J Cardiol* 2005;105:15-8.
 135. Timizheva KB, Ahmed AAM, Ait Aissa A, Aghajanyan AV, Tskhovrebova LV, Azova MM. Association of the DNA Methyltransferase and Folate Cycle Enzymes' Gene Polymorphisms with Coronary Restenosis. *Life (Basel)* 2022;12:245.
 136. Yadav U, Kumar P, Gupta S, Rai V. Distribution of MTHFR C677T Gene Polymorphism in Healthy North Indian Population and an Updated Meta-analysis. *Indian J Clin Biochem* 2017;32:399-410.
 137. Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H i sur. Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 2001;51:251-4.

138. Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, DuBard M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:806-12; discussion 812-7.
139. Zhong T, Song X, Liu Y i sur. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and maternal folic acid use with the risk of congenital heart disease. *Front Pediatr* 2022;10:939119.
140. Xu A, Wang W, Jiang X. The roles of MTRR and MTHFR gene polymorphisms in congenital heart diseases: a meta-analysis. *Biosci Rep* 2018;38:BSR20181160.
141. Wang L, Yang B, Zhou S i sur. Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene in congenital heart disease. *J Thorac Dis* 2018;10:441-447.
142. Wang Y, Zhang H, Yue S i sur. Evaluation of High Resolution Melting for MTHFR C677T Genotyping in Congenital Heart Disease. *PLoS One* 2016;11:e0151140.
143. Balderrábano-Saucedo NA, Sánchez-Urbina R, Sierra-Ramírez JA i sur. Polymorphism 677C → T MTHFR gene in Mexican mothers of children with complex congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2013;34:46-51.
144. El-Abd DM, Said RN, Hanna BM, El-Naggat NF. Maternal and offspring methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism: does it influence the prevalence of congenital heart defects in Egyptian neonates? *Comp Clin Pathol* 2012;23:317–322.
145. Hobbs CA, Cleves MA, Karim MA, Zhao W, MacLeod SL. Maternal folate-related gene environment interactions and congenital heart defects. *Obstet Gynecol* 2010;116:316-322.
146. García-Fragoso L, García-García I, Leavitt G, Renta J, Ayala MA, Cadilla CL. MTHFR polymorphisms in Puerto Rican children with isolated congenital heart disease and their mothers. *Int J Genet Mol Biol* 2010;2:43-47.
147. Marinho C, Alho I, Guerra A, Rego C, Areias J, Bicho M. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) as a susceptibility gene for tetralogy of Fallot. *Rev Port Cardiol* 2009;28:809-12.
148. van Beynum IM, den Heijer M, Blom HJ, Kapusta L. The MTHFR 677C->T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis. *QJM* 2007;100:743-53.
149. Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with

- orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143A:952-60.
150. Liu PF, Ding B, Zhang JY i sur. Association Between MTHFR C677T Polymorphism and Congenital Heart Disease. *Int Heart J* 2020;61:553-561.
 151. Yu D, Zhuang Z, Wen Z, Zang X, Mo X. MTHFR A1298C polymorphisms reduce the risk of congenital heart defects: a meta-analysis from 16 case-control studies. *Ital J Pediatr* 2017;43:108.
 152. Li Z, Jun Y, Zhong-Bao R, Jie L, Jian-Ming L. Association between MTHFR C677T polymorphism and congenital heart disease. A family-based meta-analysis. *Herz* 2015;40:160-7.
 153. Xuan C, Li H, Zhao JX i sur. Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: a meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Sci Rep* 2014;4:7311
 154. Chen KH, Chen LL, Li WG, Fang Y, Huang GY. Maternal MTHFR C677T polymorphism and congenital heart defect risk in the Chinese Han population: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2013;12:6212-9.
 155. Yin M, Dong L, Zheng J, Zhang H, Liu J, Xu Z. Meta analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects. *Ann Hum Genet* 2012;76:9-16.
 156. Ganguly A, Halder P, Pal U i sur. Risk of Atrioventricular Septal Defects in Down syndrome: Association of MTHFR C677T and RFC1 A80G polymorphisms in Indian Bengali cohort. *J. Hum. Genet. Genom* 2021;5:1–12.
 157. Elsayed GM, Elsayed SM, Ezz-Elarab SS. Maternal MTHFR C677T genotype and septal defects in offspring with Down syndrome: A pilot study. *Egyptian Journal of Medical Human Genetic* 2014;15:39–44.
 158. Carlus SJ, Abdallah AM, Al-Mazroea AH, Al-Harbi MK, Al-Harbi KM. Interaction between MTHFR Polymorphisms and Maternal Age Increases the Risk of Congenital Heart Defects in Down Syndrome. *Pakistan J. Zool* 2019;51: 865-870.
 159. Tossou AMS, Khaldia SA, Taher MB. Polymorphisms in folate-metabolizing genes as risk factors for congenital heart defects in Down syndrome in Egypt. *IJBRFA* 2015; 6: 963-966.
 160. Božović IB, Vraneković J, Cizmarević NS, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011;53:546–550.

161. Cai B, Zhang T, Zhong R i sur. Genetic variant in MTRR, but not MTR, is associated with risk of congenital heart disease: an integrated meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e89609.
162. Castiglia P, Sanna V, Azara A i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms in breast cancer: a Sardinian preliminary case-control study. *Int J Med Sci* 2019;16:1089-1095.
163. Victorino DB, Godoy MF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. Meta-analysis of Methylenetetrahydrofolate reductase maternal gene in Down syndrome: increased susceptibility in women carriers of the MTHFR 677T allele. *Mol Biol Rep* 2014;41:5491-504.
164. Wang X, Wei H, Tian Y, Wu Y, Luo L. Genetic variation in folate metabolism is associated with the risk of conotruncal heart defects in a Chinese population. *BMC Pediatr* 2018;18:287.
165. 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.
166. Hobbs CA, James SJ, Parsian A i sur. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydroflolate reductase gene. *J Med Genet* 2006;43:162-6.
167. Goldmuntz E, Woyciechowski S, Renstrom D, Lupo PJ, Mitchell LE. Variants of folate metabolism genes and the risk of conotruncal cardiac defects. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1:126-32.
168. 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.
169. Wei J, Wang T, Song X i sur. Association of maternal methionine synthase reductase gene polymorphisms with the risk of congenital heart disease in offspring: a hospital-based case-control study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2023;36:2211201.
170. 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;157:451-6.
171. 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.

172. Balduino Victorino D, de Godoy MF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and maternal risk for down syndrome: a meta-analysis. *Dis Markers* 2014;2014:517504.
173. Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V i sur. The MTRR 66A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome in Caucasian women: a case-control study and a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2014;41:5571-83.
174. van Beynum IM, Kouwenberg M, Kapusta L i sur. MTRR 66A>G polymorphism in relation to congenital heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1317-23.
175. Verkleij-Hagoort AC, van Driel LM, Lindemans J i sur. Genetic and lifestyle factors related to the periconception vitamin B12 status and congenital heart defects: a Dutch case-control study. *Mol Genet Metab* 2008;94:112-9.
176. Zeng W, Liu L, Tong Y, Liu HM, Dai L, Mao M. A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital heart defects in the Chinese Han population. *Genet Mol Res* 2011;10:2597-605.
177. Yu D, Yang L, Shen S, Fan C, Zhang W, Mo X. Association between methionine synthase reductase A66G polymorphism and the risk of congenital heart defects: evidence from eight case-control studies. *Pediatr Cardiol* 2014;35:1091-8.
178. Asim A, Agarwal S, Panigrahi I. MTRR gene variants may predispose to the risk of Congenital Heart Disease in Down syndrome patients of Indian origin. *Egypt. J. Med. Hum. Genet* 2017;18:61–66.
179. Emon IM, Al-Qazazi R, Rauh MJ, Archer SL. The Role of Clonal Hematopoiesis of Indeterminant Potential and DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase Dysregulation in Pulmonary Arterial Hypertension and Other Cardiovascular Diseases. *Cells* 2023;12:2528.
180. Muka T, Koromani F, Portilla E i sur. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: A systematic review. *Int J Cardiol* 2016;212:174-83.
181. Aran D, Toperoff G, Rosenberg M, Hellman A. Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum Mol Genet* 2011;20:670-80.
182. Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 1999;15:34-7.
183. Liang P, Song F, Ghosh S i sur. Genome-wide survey reveals dynamic widespread tissue-specific changes in DNA methylation during development. *BMC Genomics* 2011;12:231.
184. Gaunt TR, Shihab HA, Hemani G i sur. Systematic identification of genetic influences on methylation across the human life course. *Genome Biol* 2016;17:61.

185. Serra-Juhé C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez-Jurado LA. DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenetics* 2015;10:167-77.
186. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel)* 2017;8:148.
187. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002;22:480-91.
188. Chowdhury S, Cleves MA, MacLeod SL, James SJ, Zhao W, Hobbs CA. Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:69-76.
189. Yuan X, Huang J, Wen L i sur. Genome-wide DNA methylation analysis of discordant monozygotic twins reveals consistent sites of differential methylation associated with congenital heart disease. *Genomics* 2023;115:110565.
190. Mouat JS, Li S, Myint SS i sur. Epigenomic signature of major congenital heart defects in newborns with Down syndrome. *Hum Genomics* 2023;17:92.
191. Bedrick AD. Nucleated red blood cells and fetal hypoxia: a biologic marker whose 'timing' has come? *J Perinatol* 2014;34:85-6.
192. Teramo KA, Widness JA. Increased fetal plasma and amniotic fluid erythropoietin concentrations: markers of intrauterine hypoxia. *Neonatology* 2009;95:105-16.
193. Fang X, Poulsen R, Zhao L, Wang J, Rivkees SA, Wendler CC. Knockdown of DNA methyltransferase 1 reduces DNA methylation and alters expression patterns of cardiac genes in embryonic cardiomyocytes. *FEBS Open Bio* 2021;11:2364–82.
194. Fang X, Poulsen RR, Wang-Hu J i sur. Knockdown of DNA methyltransferase 3a alters gene expression and inhibits function of embryonic cardiomyocytes. *FASEB J* 2016;30:3238-55.
195. Joshi RO, Kukshal P, Chellappan S, Guhathakurta S. The study of expression levels of DNA methylation regulators in patients affected with congenital heart defects (CHDs). *Birth Defects Res* 2022;114:228-237.
196. Wang F, Zhou S, Wang Y i sur. Association of DNMT1 Gene Polymorphisms with Congenital Heart Disease in Child Patients. *Pediatr Cardiol* 2015;36:906
197. Tao H, Yang JJ, Chen ZW i sur. DNMT3A silencing RASSF1A promotes cardiac fibrosis through upregulation of ERK1/2. *Toxicology* 2014;323:42-50.
198. Touala-Chaila Z, Abderrahmane RK, Kerroumi S, Yousfi MJ, Meroufel DN, Boudjema A. Association study of the polymorphisms rs2228611 of the DNMT1 gene and

- rs1569686 of the DNMT3B gene with bladder cancer development in a sample of the Algerian population. *Mol Biol Res Commun* 2024;13:65-72.
199. Mostowska A, Sajdak S, Pawlik P, Lianeri M, Jagodzinski PP. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Mol Biol Rep* 2013;40:4893-9.
 200. Zhang YL, Wang YW, He MJ, Chang JL. An updated meta-analysis investigating the association between DNMTs gene polymorphism and gastric cancer risk. *PLoS One* 2023;18:e0293466.
 201. Gagliardi M, Strazzullo M, Matarazzo MR. DNMT3B Functions: Novel Insights From Human Disease. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:140.
 202. Liu Y, Zheng H, Guo P i sur. DNA methyltransferase 3A promoter polymorphism is associated with the risk of human spontaneous abortion after assisted reproduction techniques and natural conception. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:245-252.
 203. Moura CM, Bastos PR, Ribeiro JSV, Ribeiro MG, Amorim MR, Costa-Lima MA. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B (DNMT 3B) polymorphism and risk of Down syndrome offspring. *Saudi J Biol Sci* 2018;25:101-104.
 204. de Souza BF, Viana Filho JMC, de Queiroz Neto JN i sur. DNA Methyltransferase Genes Are Associated with Oral Mucositis and Creatinine Levels in Oncopediatric Patients. *Genes (Basel)* 2023;14:1136.
 205. Jia Z, Wu X, Cao D, Wang C i sur. Polymorphisms of the DNA Methyltransferase 1 Gene Predict Survival of Gastric Cancer Patients Receiving Tumorectomy. *Dis Markers* 2016;2016:8578064.
 206. Wang J, Li C, Wan F, Li Z, Zhang J, Zhang J. The rs1550117 A>G variant in DNMT3A gene promoter significantly increases non-small cell lung cancer susceptibility in a Han Chinese population. *Oncotarget* 2017;8:23470-23478.
 207. Jaiswal SK, Sukla KK, Kumari N, Lakhotia AR, Kumar A, Rai AK. Maternal risk for down syndrome and polymorphisms in the promoter region of the DNMT3B gene: a case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2015;103:299-305.
 208. Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:4992-5.
 209. Xiao Y, Word B, Hammons G, Lyn-Cook B. Transcriptional activity of DNMT3B in pancreatic cancer cells: effects of -149 (C→T) promoter polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;415:220-223.

210. Saradalekshmi KR, Neetha NV, Sathyan S, Nair IV, Nair CM, Banerjee M. DNA methyl transferase (DNMT) gene polymorphisms could be a primary event in epigenetic susceptibility to schizophrenia. *PLoS One* 2014;9:98182.
211. Lei L, Lin H, Zhong S i sur. DNA methyltransferase 1 rs16999593 genetic polymorphism decreases risk in patients with transposition of great arteries. *Gene* 2017;615:50-56.
212. Lyu C, Webber DM, MacLeod SL, Hobbs CA, Li M. National Birth Defects Prevention Study. Gene-by-gene interactions associated with the risk of conotruncal heart defects. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8:e1010.
213. Sheng W, Qian Y, Wang H i sur. Association between mRNA levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MBD2 and LINE-1 methylation status in infants with tetralogy of Fallot. *Int J Mol Med* 2013;32:694-702.
214. Noori NM, Shahraki Z, Karimi F, Miri-Moghaddam E. Rs4841587 in GATA4 and rs6999593 in DNMT1 gene associated with congenital heart diseases in the southeast of Iran. *Meta Gene* 2020;26:100768.
215. Tang X, Cleves MA, Nick TG i sur. Obstructive heart defects associated with candidate genes, maternal obesity, and folic acid supplementation. *Am J Med Genet A* 2015;167:1231-42.
216. Chen HL, Li ZM, Liu JF i sur. Polymorphism of the DNA methyltransferase 1 gene is associated with the susceptibility to essential hypertension in male. *Clin Exp Hypertens* 2018;40:695-701.
217. 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.
218. 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.
219. Khatami F, Noorinayer B, Ghiasi S, Mohebi R, Hashemi M, Zali MR. Lack of effects of single nucleotide polymorphisms of the DNA methyltransferase 1 gene on gastric cancer in Iranian patients: a case control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009;10:1177-82.
220. Fan H, Liu D, Qiu X i sur. A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma. *BMC Med* 2010;8:12.

221. Fan H, Zhang F, Hu J, Liu D, Zhao Z. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of colorectal cancer in Chinese: a case-control study. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:24.
222. The Nuremberg Code. [Internet]. 1947 [cited 2024 May 26]. Available from: <https://www.hhs.gov/ohrp/regulations-and-policy/belmont-report/index.html#xinform>
223. Svjetsko medicinsko udruženje. Helsinška deklaracija. *Acta stomatologica Croatica* [Internet]. 2000 [cited 2024 May 26];34(3):[341-342.]. Available from: <https://hrcak.srce.hr/11452>
224. MedCalc Statistical Software version 19.2.6 [Internet]. [cited 2024 May 26] Available from: <https://www.medcalc.org>
225. ClinCalc Kane SP. Sample Size Calculator. [Internet]. [cited 2024 May 26] Available from: <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>.
226. Yang M, Gong T, Lin X i sur. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and the risk of having a Down syndrome offspring: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2013;28:661-71.
227. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK i sur. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol* 2011;12:R10.
228. EPIGEN MeQTL Database. [Internet]. [cited 2024 May 26]. Available from: <https://epicmeqtl.kcl.ac.uk/>
229. Tomek V, Marek J, Jičínská H, Škovránek J. Fetal cardiology in the Czech Republic: current management of prenatally diagnosed congenital heart diseases and arrhythmias. *Physiol Res* 2009;58 Suppl 2:S159-S166.
230. Croti U, Mattos S, Pinto V Jr, Aiello V, Moreira V. Genética das Cardiopatias Congênitas. *Cardiol. e Cir. Cardiovasc. Pediátrica* 2012. p. 47–56.
231. Royo JL. Hardy Weinberg Equilibrium Disturbances in Case-Control Studies Lead to Non-Conclusive Results. *Cell J* 2021;22:572-574.
232. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.
233. Gilsbach R, Preissl S, Grüning BA i sur. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat Commun* 2014;5:5288.
234. Zhang D, Wu B, Wang P i sur. Non-CpG methylation by DNMT3B facilitates REST binding and gene silencing in developing mouse hearts. *Nucleic Acids Res* 2017;45:3102-3115.

235. Majstorović D, Barišić A, Božović IB i sur. DNMT3B rs2424913 as a Risk Factor for Congenital Heart Defects in Down Syndrome. *Genes (Basel)* 2023;14:576.
236. Coppedè F, Bosco P, Tannorella P i sur. DNMT3B promoter polymorphisms and maternal risk of birth of a child with Down syndrome. *Hum Reprod* 2013;28:545-50.
237. Guo QN, Wang HD, Tie LZ i sur. Parental Genetic Variants, MTHFR 677C>T and MTRR 66A>G, Associated Differently with Fetal Congenital Heart Defect. *Biomed Res Int* 2017;2017:3043476.
238. Mollo N, Scognamiglio R, Conti A, Paladino S, Nitsch L, Izzo A. Genetics and Molecular Basis of Congenital Heart Defects in Down Syndrome: Role of Extracellular Matrix Regulation. *Int J Mol Sci* 2023;24:2918.
239. 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.
240. Callejón G, Mayor-Olea A, Jiménez 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;22:3249-54.
241. 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.
242. Martínez-Frías ML, Pérez 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 Part A* 2003;140A:987–997.
243. Huang J, Mei J, Jiang L, Jiang Z, Liu H, Ding F. *MTHFR* rs1801133 C>T polymorphism is associated with an increased risk of tetralogy of Fallot. *Biomed Rep* 2014;2:172-176.
244. Gong D, Gu H, Zhang Y i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and reduced folate carrier 80 G>A polymorphisms are associated with an increased risk of conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1455-61.
245. Zhu WL, Li Y, Yan L, Dao J, Li S. Maternal and offspring MTHFR gene C677T polymorphism as predictors of congenital atrial septal defect and patent ductus arteriosus. *Mol Hum Reprod* 2006;12:51-4.

246. Noori N, Miri-Moghaddam E, Dejkam A, Garmie Y, Bazi A. Are polymorphisms in MTRR A66G and MTHFR C677T genes associated with congenital heart diseases in Iranian population? *Caspian J Intern Med* 2017;8:83-90.
247. Chao CS, Wei J, Huang HW, Yang SC. Correlation between methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and isolated patent ductus arteriosus in Taiwan. *Heart Lung Circ* 2014;23:655-60.
248. Su J, Li Z. Analysis of MTR and MTRR Gene Polymorphisms in Chinese Patients With Ventricular Septal Defect. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018;26:769-774.
249. Boot MJ, Steegers-Theunissen RP, Poelmann RE, van Iperen L, Gittenberger-de Groot AC. Cardiac outflow tract malformations in chick embryos exposed to homocysteine. *Cardiovasc Res* 2004;64:365-73.
250. Rozen R, Fraser FC, Shaw G. Decreased proportion of female newborn infants homozygous for the 677 C-->T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Med Genet* 1999;83:142-3.
251. Li D, Pickell L, Liu Y, Wu Q, Cohn JS, Rozen R. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate lead to adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Am J Clin Nutr* 2005;82:188-95.
252. McBride KL, Fernbach S, Menesses A i sur. A family-based association study of congenital left-sided heart malformations and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:825-30.
253. Zhi X, Yang B, Fan S i sur. Gender-specific interactions of MTHFR C677T and MTRR A66G polymorphisms with overweight/obesity on serum lipid levels in a Chinese Han population. *Lipids Health Dis* 2016;15:185.
254. Santos-Bezerra DP, Admoni SN, Mori RC i sur. Genetic variants in DNMT1 and the risk of cardiac autonomic neuropathy in women with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* 2019;10:985-989.
255. Ptak C, Petronis A. Epigenetic approaches to psychiatric disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 2010;12:25-35.
256. McCarthy MM, Auger AP, Bale TL i sur. The epigenetics of sex differences in the brain. *J Neurosci* 2009;29:12815-23.
257. Cheng P, Chen H, Zhang RP, Liu SR, Zhou-Cun A. Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. *Reprod Biomed Online* 2014;28:644-9.

258. Barišić A, Kolak M, Peterlin A i sur. DNMT3B rs1569686 and rs2424913 gene polymorphisms are associated with positive family history of preterm birth and smoking status. *Croat Med J* 2020;6:8-17.
259. Saxena S, Maraju PA, Choudhury S i sur. Functional Analysis of DNMT1 SNPs (rs2228611 and rs2114724) Associated with Schizophrenia. *Genet Res (Camb)* 2021;2021:6698979.
260. Sun M, Wang T, Huang P i sur. Association analysis of maternal MTHFR gene polymorphisms and the occurrence of congenital heart disease in offspring. *BMC Cardiovasc Disord* 2021;21:298.
261. Shi H, Yang S, Lin N i sur. Study on Maternal SNPs of MTHFR Gene and HCY Level Related to Congenital Heart Diseases. *Pediatr Cardiol* 2021;42:42-46.
262. Elizabeth KE, Praveen SL, Preethi NR, Jissa VT, Pillai MR. Folate, vitamin B12, homocysteine and polymorphisms in folate metabolizing genes in children with congenital heart disease and their mothers. *Eur J Clin Nutr* 2017;71:1437-1441.
263. Hassan FM, Khattab AA, Abo El Fotoh WMM, Zidan RS. A66G and C524T polymorphisms of methionine synthase reductase gene are linked to the development of acyanotic congenital heart diseases in Egyptian children. *Gene* 2017;629:59-63.
264. Koshy T, Venkatesan V, Perumal V, Hegde S, Paul SF. The A1298C Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variant as a Susceptibility Gene for Non-Syndromic Conotruncal Heart Defects in an Indian Population. *Pediatr Cardiol* 2015;36:1470-5.
265. Li D, Yu K, Ma Y, Liu Y, Ji L. [Correlation between congenital heart disease and polymorphism of MTHFR gene]. *Wei Sheng Yan Jiu* [Internet]. 2015 Nov [cited 2024 May 26];44:[933-8].
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26738386/>
266. Shi H, Yang S, Liu Y i sur. Study on Environmental Causes and SNPs of MTHFR, MS and CBS Genes Related to Congenital Heart Disease. *PLoS One* 2015;10:e0128646.
267. Sayin Kocakap BD, Sanli C, Cabuk F, Koc M, Kutsal A. Association of MTHFR A1298C polymorphism with conotruncal heart disease. *Cardiol Young* 2015;25:1326-31.
268. Mohamad NA, Vasudevan R, Ismail P i sur. Analysis of homocysteine metabolism enzyme gene polymorphisms in non-syndromic congenital heart disease patients among Malaysians. *Life Science Journal* 2014;11:318–25.

269. Sahiner UM, Alanay Y, Alehan D, Tuncbilek E, Alikasifoglu M. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and homocysteine level in heart defects. *Pediatr Int* 2014;56:167-72.
270. Zidan HE, Rezk NA, Mohammed D. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and their relation to homocysteine level in Egyptian children with congenital heart diseases. *Gene* 2013;529:119-24.
271. Pishva SR, Vasudevan R, Etemad A i sur. Analysis of MTHFR and MTRR Gene Polymorphisms in Iranian Ventricular Septal Defect Subjects. *Int J Mol Sci* 2013;14:2739-52.
272. Kotby A, Anwar M, El-Masry OA, Awady M, El-Nashar A, Meguid NA. Genetic Variants in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Egyptian Children with Conotruncal Heart Defects and their Mothers. *Maced J Med Sci* 2012; 5:78-84.
273. Obermann-Borst SA, van Driel LM, Helbing WA i sur. Congenital heart defects and biomarkers of methylation in children: a case-control study. *Eur J Clin Invest* 2011;41:143-50.
274. Lupo PJ, Goldmuntz E, Mitchell LE. Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway and the risk of conotruncal heart defects. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:630940.
275. Xu J, Xu X, Xue L i sur. MTHFR c.1793G>A polymorphism is associated with congenital cardiac disease in a Chinese population. *Cardiol Young* 2010;20:318-26.
276. Kuehl K, Loffredo C, Lammer EJ, Iovannisci DM, Shaw GM. Association of congenital cardiovascular malformations with 33 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88:101-10.
277. Shaw GM, Lu W, Zhu H i sur. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Med Genet* 2009;10:49.
278. van Driel LM, Verkleij-Hagoort AC, de Jonge R i sur. Two MTHFR polymorphisms, maternal B-vitamin intake, and CHDs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82:474-81.
279. Wintner S, Hafner E, Stonek F, Stuempflen I, Metzenbauer M, Philipp K. Association of congenital cardiac defects and the C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Prenat Diagn* 2007;27:704-8.

280. Galdieri LC, Arrieta SR, Silva CM, Pedra CA, D'Almeida V. Homocysteine concentrations and molecular analysis in patients with congenital heart defects. *Arch Med Res* 2007;38:212-8.
281. Hobbs CA, James SJ, Jernigan S i sur. Congenital heart defects, maternal homocysteine, smoking, and the 677 C>T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: evaluating gene-environment interactions. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:218-24.
282. van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M i sur. Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *Eur Heart J* 2006;27:981-7
283. Lee CN, Su YN, Cheng WF i sur. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation with congenital heart diseases *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:1134-40.
284. Shaw GM, Iovannisci DM, Yang W i sur. Risks of human conotruncal heart defects associated with 32 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes. *Am J Med Genet A* 2005;138:21-6.
285. Storti S, Vittorini S, Iascone MR i sur. Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:276-80.
286. Wang W, Wang Y, Gong F, Zhu W, Fu S. MTHFR C677T polymorphism and risk of congenital heart defects: evidence from 29 case-control and TDT studies. *PLoS One* 2013;8:e58041.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Klinička obilježja Downova sindroma

Slika 2. Faze srčane morfogeneze

Slika 3. Najčešće vrste prirodnih srčanih grešaka kod osoba s Downovim sindromom

Slika 4. Kritična regija za prirodene srčane greške u Downovu sindromu

Slika 5. Metabolizam folata i metionina

Popis tablica

Tablica 1. Modificirana Clarkova klasifikacija prirodnih srčanih grešaka

Tablica 2. Čimbenici rizika za prirodene srčane greške u Downovu sindromu – pregled istraživanja

Tablica 3. Povezanosti varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i nesindromskih prirodnih srčanih grešaka – pregled istraživanja

Tablica 4. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i nesindromskih prirodnih srčanih grešaka – pregled istraživanja – metaanalize

Tablica 5. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i prirodnih srčanih grešaka u Downovu sindromu – pregled istraživanja

Tablica 6. Opis polimorfizama, početnica, uvjeta PCR i restrikcijskih reakcija, veličina PCR produkata i restrikcijskih fragmenata u analizi polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Tablica 7. Sadržaj PCR reakcijskih smjesa za analizu polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Tablica 8. Sadržaj reakcijskih smjesa za restrikciju polimorfizama gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT*

Tablica 9. Demografski podaci DSPSG+ (N=134) i DSPSG- (N=124) skupine i raspodjela vrsta PSG-a prema spolu u DSPSG+ skupini

Tablica 10. Učestalost genotipova i alela varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* u ispitanika (N=134) i kontrola (N=124)

Tablica 11. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

Tablica 12. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

Tablica 13. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs2424913 i *MTRR* rs1801394 u u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

Tablica 14. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=129) i kontrola (N=120)

Tablica 15. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* rs1801133 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=134) i kontrola (N=124)

Tablica 16. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* rs1801131 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=133) i kontrola (N=124)

Tablica 17. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *DNMT3B* rs2424913 u ispitanika (N=123) i kontrola (N=115)

Tablica 18. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs 1569686 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=130) i kontrola (N=124)

Tablica 19. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs 1569686 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=130) i kontrola (N=124)

Tablica 20. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *DNMT3A* rs1550117 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

Tablica 21. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *DNMT3B* rs1569686 u ispitanika (N=127) i kontrola (N=120)

Tablica 22. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *DNMT3B* rs2424913 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

Tablica 23. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=129) i kontrola (N=120)

Tablica 24. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=128) i kontrola (N=120)

Tablica 25. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *DNMT3B* rs1569686 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

Tablica 26. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

Tablica 27. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

Tablica 28. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

Tablica 29. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs1569686 i *DNMT3B* rs2424913 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

Tablica 30. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs1569686 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=130) i kontrola (N=124)

Tablica 31. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* rs1801133 i *MTRR* rs1801394 u u ispitanika (N=133) i kontrola (N=124)

Tablica 32. Povezanost genetičkih modela gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s predispozicijom za prirođene srčane greške kod osoba s Downovim sindromom

Tablica 33. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs2424913 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 45) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 79)

Tablica 34. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801133 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 49) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 85)

Tablica 35. Učestalost i povezanost varijante gena *MTRR* rs1801394 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 30) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 103)

Tablica 36. Povezanost varijanti gena *MTHFR* rs1801133 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 37. Povezanost varijanti gena *MTHFR* rs1801131 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 38. Povezanost varijanti gena *MTRR* rs1801394 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 39. Povezanost varijanti gena *DNMT1* rs2228611 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 40. Povezanost varijanti gena *DNMT3A* rs1550117 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 41. Povezanost varijanti gena *DNMT3B* rs1569686 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 42. Povezanost varijanti gena *DNMT* rs2424913 sa spolom kod osoba s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom

Tablica 43. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT1* rs2228611 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 31) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 98)

Tablica 44. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT1* rs2228611 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 30) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 99)

Tablica 45. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT1* rs2228611 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 46) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 83)

Tablica 46. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3A* rs1550117 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 30) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 96)

Tablica 47. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3A* rs1550117 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 29) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 97)

Tablica 48. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3A* rs1550117 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 45) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 81)

Tablica 49. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs1569686 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 5) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 87)

Tablica 50. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs1569686 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 10) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 82)

Tablica 51. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs1569686 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 31) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 61)

Tablica 52. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs2424913 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 30) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 95)

Tablica 53. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs2424913 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 29) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 96)

Tablica 54. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801133 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 31) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 103)

Tablica 55. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801133 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 31) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 103)

Tablica 56. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801131 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 31) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 103)

Tablica 57. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801131 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 31) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 103)

Tablica 58. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801131 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 49) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 85)

Tablica 59. Učestalost i povezanost varijante gena *MTRR* rs1801394 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 31) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 102)

Tablica 60. Učestalost i povezanost varijante gena *MTRR* rs1801394 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 49) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 84)

POPIS POKRATA

AO	aorta
ASD	atrijski septalni defekt (engl. <i>atrial septal defect</i>)
ASMR	dobno standardizirana stopa smrtnosti (engl. <i>Age-Standardized Mortality Rate</i>)
AVSD	atrioventrikularni septalni defekt (engl. <i>atrioventricular septal defect</i>)
BHMT	betain-homocistein metiltransferaza (engl. <i>betaine-homocysteine methyltransferase</i>)
CAVC	kompletni atrioventrikularni kanal
CBS	cistationin beta-sintaza (engl. <i>cystathionine β-synthase</i>)
CGIs	CpG otoci (engl. <i>CpG islands</i>)
CH ₃	metilna skupina (engl. <i>methyl group</i>)
Chr. 21	kromosom 21 (engl. <i>chromosome 21</i>)
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
CNV	varijante broja kopija (engl. <i>copy number variations</i>)
COL6A1	<i>collagen type VI alpha 1 chain</i>
COL6A2	<i>collagen type VI alpha 2 chain</i>
CpG	<i>cytosine-phosphate-guanine</i>
DA	arterijski duktus (engl. <i>ductus arteriosus</i>)
DA	desna atrij
dbSNP	engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>
DHF	dihidrofolat (engl. <i>dihydrofolate</i>)
DHFR	dihidrofolat reduktaza (engl. <i>dihydrofolate reductase</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid, DNA</i>)
dNTP	deoksinukleotid
DNMT	metiltransferaze DNK (engl. <i>DNA methyltransferases</i>)
DNMT1	DNK metiltransferaza 1 (engl. <i>DNA methyltransferase 1</i>)
DNMT2	DNK metiltransferaza 2 (engl. <i>DNA methyltransferase 2</i>)
DNMT3A	DNK metiltransferaza 3 alfa (engl. <i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>)
DNMT3B	DNK metiltransferaza 3 beta (engl. <i>DNA methyltransferase 3 beta</i>)
DNMT3L	DNK metiltransferaza 3L (engl. <i>DNA methyltransferase 3 like</i>)
DS	Downov sindrom (engl. <i>Down syndrome</i>)
DS-CHD	engl. <i>DS-CHD critical region</i>

DSCR	Down sindrom kritična regija (engl. <i>Down syndrome critical region</i>)
DSCAM	engl. <i>DS cell adhesion molecule</i>
DSPSG ⁺	osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom
DSPSG ⁻	osobe s Downovim sindromom, bez prirođene srčane greške
dTMP	deoksitimidinmonofosfat (engl. <i>deoxythymidine monophosphate</i>)
dUMP	deoksiuridin monofosfat (engl. <i>deoxyuridine monophosphate</i>)
DV	desni ventrikl
EDTA	engl. <i>ethylenediamine tetra-acetic acid</i>
GATA4	engl. <i>GATA binding protein 4</i>
GSH	glutation (engl. <i>glutathione</i>)
Has3	hijalurona sintaze 3 (engl. <i>hyaluronan synthase 3</i>)
HWE	Hardy-Weinbergova ravnoteža (engl. <i>Hardy–Weinberg Equilibrium</i>)
I-TGA	korigirana transpozicija velikih krvnih žila
ITM	indeks tjelesne mase
KCNJ6	engl. <i>potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 6</i>
KSD	konotrunkalni srčani defekt (engl. <i>conotruncal heart defect, CTD</i>)
LA	lijeva pretklijetka (engl. <i>left atrium</i>)
LA	lijevi atrij
LC	lijeva karotidna arterija (engl. <i>left carotid artery</i>)
LV	lijeva klijetka (engl. <i>left ventricle</i>)
LV	lijevi ventrikl
LSC	lijeva potključna arterija (engl. <i>left subclavian artery</i>)
MBD2	engl. <i>methyl-CpG binding domain protein 2</i>
MgCl	magnezijev klorid
mikroRNK	male molekule ribonukleinske kiseline (engl. <i>microRNA</i> , miRNA)
MTHFD	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (engl. methylenetetrahydrofolate dehydrogenase)
MTHFR	N5,N10-metilentetrahydrofolat-reduktaza (engl. <i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i>),
MTHFR	metilentetrahydrofolat reduktaza (engl. <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>)
MTRR	N5-metiltetrahydrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza (engl. <i>5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase</i>)

MTRR	5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaza (engl. <i>5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase</i>)
MTR	metionin-sintetaza (engl. <i>methionine synthase</i>)
mQTL	lokusi kvantitativnih svojstava metilacije (engl. <i>methylation quantitative trait loci</i>)
NDBS	mrlje sasušene krvi (engl. <i>newborn dried blood spots</i>)
nRBC	crvene krvne stanice s jezgrom (engl. <i>nucleated red blood cells</i>)
NTD	defekt neuralne cijevi (engl. <i>neural tube defect</i>)
OFT	izlazni trakt srca (engl. <i>outflow tract</i>)
OHD	opstruktivni srčani defekt (engl. <i>Obstructive Heart Defects</i>)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i>)
<i>p</i>	<i>p</i> – vrijednost
PA	plućna arterija (engl. <i>pulmonary artery</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
PDA	otvoreni arterijski duktus (engl. <i>patent ductus arteriosus</i>)
PSG	prirođene srčane greške (engl. <i>Congenital heart defects, CHDs</i>)
RA	desna pretklijetka (engl. <i>right atrium</i>)
RC	desna karotidna arterija (engl. <i>right carotid artery</i>)
RCAN1	engl. <i>regulator of calcineurin 1</i>
REST	engl. <i>repressor element 1 (RE1)</i>
RFC1	nosač reduciranih folata 1 (engl. <i>reduced folate carrier</i>)
RSC	desna potključna arterija (engl. <i>right subclavian artery</i>)
RV	desna klijetka (engl. <i>right ventricle</i>)
SAH	S-adenozilhomocistein (engl. <i>S-adenosyl homocysteine</i>)
SAM	S-adenozilmetionin (engl. <i>S-adenosylmethionine</i>)
SDI	socioekonomski indeks (engl. <i>Socio-Demographic Index</i>)
SHMT	serin hidroksimetiltransferaza (engl. <i>serine hydroxymethyltransferase</i>)
SNV	varijanta jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide variant</i>)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SR	omjer spolova (engl. <i>sex ratio</i>)
TCR	tanskobalamin receptor (engl. <i>tanscobalamin receptor</i>)

TGA	transpozicija velikih arterija (engl. <i>transposition of the great arteries</i>)
THF	tetrahidrofolat (engl. <i>tetrahydrofolate</i>)
TOF	Fallotova tetralogija (engl. <i>Tetralogy of Fallot</i>)
TYMS	timidilat sintaza (engl. <i>thymidilate synthase</i>)
VSD	ventrikularni septalni defekt (engl. <i>ventricular septal defect</i>)
5,10-metilenTHF	5,10-metilentetrahidrofolat (engl. <i>5,10-methylenetetrahydrofolate</i>)
5-metilTHF	<i>N5-metiltetrahidrofolat</i> (engl. <i>5-methyltetrahydrofolate</i>)
5Mc	5-metilcitozin (engl. <i>5-methylcytosine</i>)
χ^2	hi kvadrat (od engl. <i>chi square</i>)

PRIVITCI

Prilog 1. Čimbenici rizika za prirodene srčane greške u Downovu sindromu

Tablica 2. Čimbenici rizika za prirodene srčane greške u Downovu sindromu – pregled istraživanja

Čimbenici rizika	Rezultati	Referenca
Spol dojenčadi	- kombinacija PDA i ASD (44,4 %) najčešći srčani defekti u žena	[29]
	- ženski spol veća učestalost PSG-a ($p < 0,001$)	[5]
	- prevalencija PSG-a značajno veća u žena ($p = 0,010$)	[90]
	- ženski spol: za ukupne PSG ($p < 0,01$); ASD ($p < 0,01$) i teške PSG ($p < 0,05$); AVSD i VSD ($p \leq 0,05$)	[91]
	- ženski spol (12 %) veći rizik za PSG; osobito AVSD	[83]
	- VSD prevladava kod muškaraca (41,1%)	[29]
	- muški spol (53,8 %); ženski spol (46,2 %)	[77]
	- muški spol (52,8 %); ženski spol (47,2 %)	[92]
	- muški spol (55 %); ženski spol (45 %)	[84]
- muški spol (59 %); ženski spol (41 %)	[86]	
Porođajna težina	- niska porođajna težina (<2500 g) ($p = 0,034$); značajne razlike u gestacijskoj dobi pri porođu i porođajne težine između DSPSG+ i DSPSG-	[93, 82]
Dob roditelja	rizik za dijete DSPSG+	
	- dobna skupina majki 20 – 25 godina (30,6 %); 26 – 30 godina (51 %); > 31 godine (71,4 %)	[84]
	- dobna skupina očeva 21 – 30 godina (39,2 %); 31 – 40 godina 55,9 %; ≥ 40 godina 100 %	
	- dob majke ≥ 35 godina	[4, 82]
- dob majke > 32 godine	[94]	
Krvno srodstvo roditelja	- 58,1 % rođene djece s DS-om do trećeg stupnja krvnog srodstva imali su PSG	[12]
	- $p = \leq 0,001$; OR=1,8 [CI: 1,6 – 2,3]	[93]
Obrazovanje roditelja	- niži stupanj obrazovanja očeva ($p = 0,003$)	[86]
Spontani pobačaj	- pozitivna povezanost između povijesti spontanijih pobačaja majke i povećanog rizika od DSPSG	[4]
Suplementacija folne kiseline	- skupina majki (<i>MTHFR</i> rs1801133 genotip CT/TT), bez suplementacije folne kiseline tijekom trudnoće: ($p = 0,027$); povećani izgledi za dijete s DSPSG (OR= 4,75; $p = 0,040$)	[4]
	- majke koje nisu uzimale folnu kiselinu značajno veći rizik od PSG-a	[138]
	- nedostatna suplementacija folne kiseline značajan rizik za DSPSG+, analiza po podtipovima PSG-a, rizik za pojavu ASD-a	[86]
	- nedostatna suplementacije folne kiseline $p = \leq 0,001$; OR= 2 [CI: 1,6 – 2,4]	[93]
	- nedostatna suplementacija folne kiseline češća među dojenčadi s DSAVSD	[96]
Indeks tjelesne mase	- viši antepartalni ITM u majki dojenčadi s DSPSG ($p = 0,045$)	[86]
	- pretilost majke: $p = \leq 0,001$, OR=2,7	[93]
	- stupanj pretilosti majke od 1 do 3 (ITM 30 do <35 odnosno ≥35) povećan rizik za PSG (16 % i 34 %)	[87]
Izloženost akutnoj/kroničnoj bolesti tijekom trudnoće;	- infekcija $p = \leq 0,001$, OR=1,8 dijabetes melitus $p = 0,004$; OR=1,5	[93]
Korištenje duhana, antibiotika i oralnih kontraceptiva	- pasivno pušenje ($p = \leq 0,001$); OR=2,1	[93]
	- pušenje povezanost s rizikom od PSG-a; u kombinaciji s VSD-om	[87]
	- korištenje antibiotika i oralnih kontraceptiva; izloženost drogama tijekom trudnoće (OR = 4,91)	[95]
Paritet	- prevalencija PSG-a značajno veća u djece majki s paritetom 2 i 3 te ≥4 i više u odnosu na prvoročke	[93]
	- 32 % prvorođene djece ima PSG; drugorođene 51 %, treće rođene 71 %	[84]
Zaposlenje	- radničko zanimanje majke rizik za PSG u djece (OR =5,45), zanimanja "bijelih ovratnika" (engl. <i>white-collar occupation</i>) smanjen rizik za PSG (OR =0,83) u usporedbi s nezaposlenim osobama	[141]

PDA – otvoreni ductus arteriosus; ASD – atrijski septalni defekt; PSG – prirodene srčane greške, AVSD – atrioventrikularni septalni defekt; VSD – ventrikularni septalni defekt; ITM – indeks tjelesne mase; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirodnim srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; OR – Odds ratios; CL – 95% confidence intervals; p – vrijednost; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza

Prilog 2. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i nesindromskih prirođenih srčanih grešaka

Tablica 3. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i nesindromskih prirođenih srčanih grešaka – pregled istraživanja

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Isključni kriterij sindromske PSG	Vrsta PSG	Rezultati	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac				
<i>MTRR</i> rs1801394	Kina	-	740/683	-	DA	PSG	Nema uočene povezanosti	[169]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Indija	50/100	-	-	DA	PSG	Nema uočene povezanosti	[15]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Kina	-	569/652	-	DA	PSG	rs1801131 GG vs TT OR = 5,18; 95 % CI 2,77 – 9,71	[260]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Kina	-	338/306	-	-	PSG	rs1801133 OR = 6,24; 95 % CI 2,87 – 13,56	[261]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	Kina	-	193/234	-	-	KSD	rs1801133 TT vs CC OR = 2,47; 95 % CI 1,42 – 4,32 rs1801131 AC vs AA OR = 2,05; 95 % CI 1,28 – 3,21 CC vs AA OR = 2,20; 95 % CI 1,38 – 3,58	[164]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Kina	346/237	-	-	-	PSG	rs1801133 alel T OR = 2,09; 95 % 1,455 – 3,024	[141]
<i>MTRR</i> rs1801394	Kina	183/201	-	-	-	VSD	učestalost genotipa AG u bolesnika s VSD-om značajno se razlikovala od one u kontrolnoj skupini (OR = 3,147)	[258]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	Indija	32/32	32/32	-	-	PSG	rs1801133 CT čimbenik rizika za PSG; kombinacija rs1801133 i rs1801394 među oba para majka-dijete povećan rizik za PSG	[262]
<i>MTHFR</i> rs1801133 <i>MTRR</i> rs1801394	Indija	71 VSD 74 TOF/ 147	-	-	-	VSD TOF	rs 1801133 OR = 7,3; 95 % CI: 0,8 – 61 VSD OR = 10; 95 % CI 1– 92,2 rs1801394 AG+GG OR = 1,6; 95 % CI: 1 – 2,6 AG+GG čimbenik rizika za TOF OR = 1,8; 95 % CI: 1 – 3,3	[246]
<i>MTRR</i> rs1801394	Egipat	100/100	-	-	DA	PSG	rs1801394 povećan rizik od acijanotičnih PSG-a	[263]

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Isključni kriterij sindromske PSG	Vrsta PSG	Rezultati	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac				
<i>MTHFR</i> rs1801133 <i>MTRR</i> rs1801394	Kina	-	21 VSD 78 neVSD 114 kontrola		DA	VSD	rs1801133 povezan s fetalnim ne-VSD-om; rs1801394 povezan s fetalnim VSD-om	[237]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Kina	147/148	-	-	DA	PSG	TT vs CC OR = 6; 95 % CI 2,9 – 12,4 CT vs CC OR = 3,04; 95 % CI 1,55 – 5,95 dominantni model TT/CT vs CC OR = 3,91; 95 % CI 2,06 – 7,44 recesivni model TT vs CT/CC OR = 2,62; 95 % CI 1,60 – 7,44 alel T vs C OR = 2,26; 95 % CI 1,64 – 3,12	[141]
<i>MTHFR</i> rs1801131	Indija	96/100	-	-	DA	KSD	rs1801131 CC OR = 4,073; 95 % CI 1,785 – 9,292	[264]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Kina	150/150	-	-	-	PSG	rs1801133 CT OR = 2,249; 95 % CI 1,305 – 3,877 rs1801133 TT OR = 3,121; 95 % CI 1,612 – 6,043	[265]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Kina	138/207;	137/207	-	-	PSG	rs1801131 CC OR = 3,67; 95 % CI 1,12 – 12,05) rs1801131 u djece OR = 1,42; 95% CI = 1,00 – 2,44	[266]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Turska	79/99	-	-	DA	KSD	rs1801131 AC: OR = 2,48; 95 % CI 1,24 – 4,95 CC: OR = 3,01; 95 % CI 1,16 – 7,83 AC+CC: OR = 2,60; 95 % CI 1,36 – 4,99 C alel (p = 0,028)	[267]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	Malezija	150/150	-	-	DA	PSG	rs1801131 čimbenik rizika za PSG	[268]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Tajvan	17/34	-	-	DA	PDA	rs1801131 čimbenik rizika za PSG	[247]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Kina	173/207	-	-	DA	TOF	rs1801133 TT vs CC OR = 1,67; 95 % CI 1,01 – 2,75; recesivni model CC/CT i TT genotip OR = 1,81; 95 % CI: 1,15 - 2,84; p = 0,010	[243]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Turska	163/93	-	-	DA	PSG	Nema uočene povezanosti	[269]

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Isključni kriterij sindromske PSG	Vrsta PSG	Rezultati	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac				
<i>MTHFR</i> rs1801133	Meksiko	-	31/62	-	-	PSG	rs1801133 TT OR = 5,9; 95 % CI 1,67 – 20,63	[143]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	Kanada	156/69	181/ 65	-	DA	PSG	rs1801394 protektivni čimbenik za VSD	[120]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Egipat	80/80	80/80	-	DA	PSG	rs1801133 TT rs1801131 CC čimbenici rizika za PSG	[270]
<i>MTHFR</i> rs1801133 <i>MTRR</i> rs1801394	Iran	123/125	-	-	DA	VSD	rs1801394 čimbenik rizika za VSD	[271]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	Kina	160/180	-	-	-	PSG	rs1801133 u kombinaciji s <i>MTHFD</i> G1958A i <i>MTR</i> A2756G čimbenik rizika za PSG; rs1801133 CT /TT i rs1801394 AG/GG ne predstavljaju čimbenike rizika za PSG	[112]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Kina	244/136	-	-	DA	KSD*	rs1801133 TT OR = 3,46; 95 % CI 1,83 – 6,55	[244]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Egipat	26/18	26/18	-	DA	PSG	Neonatalni CT i TT VSD: OR = 5,2; 95 % CI 1,2 – 23,04; p= 0,025 PDA: OR = 33,8; 95 % CI 3,5–330,622; p= 0,000 neonatalni i majčin CT i TT TGA: OR = 26; 95 % CI 2,6–259,2; p=0,001; OR = 10 95 % CI 1,0 – 95,2; p=0,044	[144]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Egipat	30/30	30/30	-	DA	PSG	Značajna razlika između slučajeva i kontrolnih skupina i između njihovih majki u pogledu polimorfizama gena <i>MTHFR</i> u egzonu 7	[272]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Nizozemska	139/183	-	-	NE	PSG	Nema uočene povezanosti	[273]
<i>MTRR</i> rs1801394	Kina	599/672	-	-	DA	PSG	rs1801394 GG genotip (OR = 1,545)	[176]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	SAD	727			DA	KSD	- povezanost naslijeđenog genotipa rs1801131 i KSD - interakcija majčinog rs1801133/CBS 844ins68 može biti povezana s rizikom od KSD u potomaka	[274]
<i>MTHFR</i> rs1801133	SAD	-	572/363	-	DA	PSG	rs1801133 i stil života majke čimbenik rizika za PSG	[145]

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Isključni kriterij sindromske PSG	Vrsta PSG	Rezultati	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac				
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Portoriko	27/220	27/220	-	DA	PSG	rs1801133 čimbenik rizika za PSG	[146]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Kina	502/527	-	-	DA	PSG	Nema uočene povezanosti	[275]
<i>MTHFR</i> rs1801133	SAD	328/477	-	-	-	PSG	rs1801133 TT OR=3,5; 95 % CI 1,4 – 8,6	[276]
<i>MTHFR</i> rs1801133 <i>MTRR</i> rs1801394	SAD	214/220	-	-	-	KSD	Nema uočene povezanosti	[277]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Portugal	38/251	-	-	-	TOF	Čimbenik rizika za TOF	[147]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	SAD	651			DA	KSD	rs1801131 AC vs AA: OR = 0,67; 95 % CI 0,53 – 0,84 CC vs AA: OR = 0,74; 95 % CI 0,50 – 1,12	[167]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Nizozemska	229/251			DA	PSG	Nisu jaki čimbenici rizika	[278]
<i>MTRR</i> rs1801394	Nizozemska	229/251	230/251	229/251	DA	PSG	Genotipovi rs1801394 GG i TC 776 GG kod majki i djece mogu pridonijeti riziku od PSG-a, osobito kada je status vitamina B12 u majke nizak.	[175]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Austrija	-	31/31	31/31	DA	PDG	Nema uočene povezanosti	[279]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Brazil	58/38	49/26	-	DA	PSG	Nema uočene povezanosti	[280]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	SAD	-	275/118	-	DA	PSG	Povišene vrijednosti homocisteina OR= 1,64 [95% CI 1,41-1,91] pušenje OR= 1,72 [95% CI 0,95-3,14] kombinacija: pušenje, visoke razine homocisteina i rs1801133 CC OR=11,8 [95% CI 2,59-53,3]	[281]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	SAD	347 343	341 335	290 276	DA	PSG	Protektivni učinak rs1801131	[166]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Nizozemska	165/220	158/261	-	DA	PSG	rs1801133 CT i TT genotip + unos folne kiseline OR = 3,3; 95 % CI 1,46 – 7,32 za konotrunkalne PSG u potomaka OR= 6,3; 95 % CI 2,32 – 17,27	[282]

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Isključni kriterij sindromske PSG	Vrsta PSG	Rezultati	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac				
<i>MTRR</i> rs1801394	Nizozemska	169/213	159/245	-	DA	PSG	rs1801394 - pojedinačno nema uočene povezanosti - GG u kombinaciji s visokom koncentracijom metilmalonske kiseline (OR= 3,3; 95 % CI 0,86–12,50)	[174]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Kina	56/104			-	ASD PDA	ASD: TT prema CT OR= 4,08; 95 % CI 1,28 – 13,24 PDA: TT prema CC i CT OR=3,44; 95 % CI 0,89 – 16,13 i 2,38; 95 % CI 0,92-6,14	[245]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Kina	213/195	-	-	-	PSG	Povezanost s određenim vrstama PSG-a	[283]
<i>MTHFR</i> rs1801133	SAD	155/437	-	-	DA	KSD	Nema uočene povezanosti	[284]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Brazil	91 PSG + 147 roditelji			-	PSG	Nema uočene povezanosti	[134]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	SAD	197			DA	PSG	Nema uočene povezanosti	[252]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Italija	103	103/200	103	DA	KSD	Nema uočene povezanosti	[285]
<i>MTHFR</i> rs1801133	SAD	-	26/116	-	DA	PSG	rs1801133 ili poremećaj razine homocisteina (50 %; p = 0,003); kombinacija poremećaja razine homocisteina i rs1801133 (12 %; p = 0,006)	[138]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Njemačka	114/228	-	-	DA	PSG	rs1801133 TT OR = 2,2; CI 95 % 1,2 – 4,3	[137]

MTHFR – metilentetrahydrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahydrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; PSG – prirodene srčane greške; KSD – konotrunkalni srčani defekti; VSD – ventrikularni septalni defekt; TOF – Fallotova tetralogija; TGA – transpozicija velikih arterija; PDA – otvoreni arterijski duktus; ASD – atrijski septalni defekt; *MTHFD* – metilenetetrahidrofolate dehidrogenaza; *MTR* - metionin-sintetaza; OR – Odds ratios; CI – 95% confidence intervals; *p* – vrijednost

Tablica 4. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i nesindromskih prirođenih srčanih grešaka – metaanalize

Polimorfizam	Broj članaka	Isključni kriterij sindromske PSG	Rezultati	Referenca
<i>MTHFR</i> rs 1801133	3	DA	T vs C alel OR= 1,89; 95 % CI 1,31 – 2,74; p < 0,0004	[12]
<i>MTHFR</i> rs 1801133	26	NE	rs1801133 čimbenik rizika za PSG u ukupnoj populaciji dominantni model: OR = 1,38, 95 % CI = 1,14 – 1,69 recesivni model: OR = 1,49, 95 % CI = 1,83 – 1,87 alel model: OR = 1,33, 95 % CI = 1,14 – 1,55 - stratifikacija prema etničkoj pripadnosti, u azijskoj populaciji dominantni model: TT + TC vs CC; OR = 1,50, 95 % CI = 1,12 – 2,01 recesivni model: TT vs TC + CC; OR = 1,67, 95 % CI = 1,21 – 2,31 alel model T vs C: OR = 1,42; 95 % CI: 1,15 – 1,76	[15]
<i>MTHFR</i> rs 1801133	15	-	recesivni model: OR: 1,35, 95 % CI: 1,06 – 1,71, p = 0,006 za ukupnu populaciju. azijati u recesivnom modelu OR = 1,35, 95 % CI = 1,06-1,71, p = 0,014	[150]
<i>MTHFR</i> rs 1801133 rs18011131	32	-	rs 1801133 povezan sa značajno povećanim rizikom za razvojem PSG-a u fetalnoj populaciji; alelni model; OR=1,32, 95 % CI =1,14 – 1,53 rs18011131 recesivni model OR = 1,69, 95 %CI = 1,25 – 2,30 dominantni model OR = 1,35, 95 %CI = 1,11 – 1,64 heterozigotni model OR = 1,20, 95 % CI = 1,01 – 1,41 homozigotni model OR =1,75, 95 % CI = 1,31 – 2,33 ukupna populacija recesivni model CC vs CA+AA: OR = 1,42, 95 % CI =1,10 – 1,84, p = 0,008 zaštitnu ulogu rs18011131 alela C potrebno je dodatno istražiti	[126]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801394	47	NE	rs1801131 i rs1801133 rizik za razvoj PSG-a u azijske i bijele populacije rs1801394 rizik za razvoj PSG-a u azijske populacije	[140]
<i>MTHFR</i> rs1801131	16	NE	rs1801131 čimbenik rizika za razvoj PSG recesivni model CC vs AA+AC: OR = 1,38, 95 % CL: 1,10 – 1,73 za cjelokupnu populaciju; analiza podskupina – povezanost kod osoba bez DS-om u genetskim modelima CC vs AA; CC vs AC i recesivni model	[151]
<i>MTHFR</i> rs1801133	19	-	Fetus: TT genotip recesivni model (TT prema TC+CC: OR = 1,26; [95 % CI = 1,06-1,51]; p = 0,009) Majke: TT genotip recesivni model (TT prema TC+CC: OR = 1,52; [95 % CI = 1,09-2,11]; p = 0,01)	[152]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	35	-	rs1801133 čimbenik rizika u svim genetičkim modelima za azijsku djecu i majke - T vs C alel za bijelu pedijatrijsku populaciju: OR = 1,163, 95 % CI = 1,008-1,342 - T vs C alel (ukupno) OR = 1,125, 95 % CI = 1,043-1,214) - dominantni model OR = 1,216, 95 % CI: 1,096–1,348 za populaciju majki bijele rase. rs1801131 - CC vs AC za bijelu pedijatrijsku populaciju OR = 1,484, 95 % CI = 1,035 – 2,128	[153]
<i>MTRR</i> rs1801394	8	NE	G alel povećan rizik za razvoj PSG OR = 1,35, 95% CI = 1,14-1,59, p<0,001	[161]

Polimorfizam	Broj članaka	Isključni kriterij sindromske PSG	Rezultati	Referenca
<i>MTRR</i> rs1801394	8	DA	G vs A: OR: 1,163, 95 % CI 1,016 – 1,330 GG vs AA: OR = 1,332, [95 % CI 1,020 –1,740, p = 0,035 dominantni model GG/AG vs AA: OR= 1,218, 95 % CI 1,001 – 1,482 G vs A: OR=1,163, 95 % CI 1,016 –1,330 u populaciji azijata GG vs AA: OR = 1,427, 95 % CI 1,017 –2,001 G vs A: OR = 1,203, 95 % CI 1,018 – 1,422] Nije dokazana povezanost u bijeloj populaciji.	[177]
<i>MTHFR</i> rs1801133	22	DA	Nema uočene povezanosti	[16]
<i>MTHFR</i> rs1801133	29	DA	Alelni model pokazao je značajnu povezanost s rizikom za razvoj PSG-a azijska populacija: OR=1,46, 95 % CI=1,16 – 1,83 europska populacija: OR=1,30, 95 % CI=1,04 – 1,62	[286]
<i>MTHFR</i> rs1801133	20	NE	Čimbenik rizika za razvoj PSG-a	[155]
<i>MTHFR</i> rs1801133	6	NE	Značajna povezanost između majčinog polimorfizma rs1801133 i PSG-a CC vs TT; OR = 0,65, 95 % CI = 0,44 – 0,96 u kineskoj populaciji	[154]
<i>MTHFR</i> rs1801133	13	-	Nema uočene povezanosti	[148]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	11 (PSG)	-	Toksični učinak homocisteina je važan čimbenik rizika za fetalni PSG. rs1801133 i rs1801131 nisu čimbenici rizika za razvoj PSG- a	[149]

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; PSG – prirodne srčane greške; OR – Odds ratios; CL – 95% confidence intervals; *p p* – vrijednost

Prilog 3. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i prirođenih srčanih grešaka u Downovu sindromu

Tablica 5. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i prirođenih srčanih grešaka u Downovu sindromu – pregled istraživanja

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Vrsta PSG	Nalaz	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac			
<i>MTHFR</i> rs1801133 <i>MTRR</i> rs1801131	Indija	-	MDSPSG+ 40 MDSPSG- 60 Kontrola 50	-	PSG	rs1801133 CT/TT + unos folne kiseline tijekom trudnoće OR= 1,909; 95 % CI 0,628 ±5,79 bez unosa folne kiseline tijekom trudnoće OR= 6,909; 95 % CI 1,23 ±38,51	[4]
<i>MTHFR</i> rs1801133	Indija	DS-AVSD 479 DS 540 Kontrol-AVSD 321 Kontrola 409	-	-	AVSD	- alel T povezan s povećanim rizikom za AVSD u skupinama: DS-AVSD vs kontrolna skupina OR=1,75, p< 0,0001 kontrol-AVSD vs kontrolna skupinu OR=1,325, p=0,021 DS-AVSD vs Kontrol-AVSD OR=321, p=0,01 - značajno veću učestalost u skupini DS-AVSD vs kontrolna skupina: - rs 18011330 CT OR=1,67; p=0,0004 - rs 1801130 TT OR=3,418; p<0,0001 <i>in-silico</i> analiza: rs1801133 utječe na funkciju proteina i smanjuje aktivnost enzima	[156]
<i>MTRR</i> rs1801294	Hrvatska	78/77	72/74	-	PSG	Nema uočene povezanosti - majke rs1801294 GG + unos folne kiseline od 4-tog tjedna prije trudnoće do 8-og tjedna trudnoće češće imaju DSPSG+ dijete (p = 0,028) u odnosu na majke koje nikada nisu uzimale folnu kiselinu. (p = 0,015).	[17]
<i>MTRR</i> rs1801294	Indija	60/60	-	-	PSG	rs1801294 povećan rizik za razvoj PSG-a AG vs AA OR = 13,3; 95 % CI = 1,59 – 111; p <0,001 dominantni model AG + GG vs AA; OR = 1,49 95 % CI: 0,73 – 3,07, p= 0,20	[178]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Saudijska Arabija	26/73	-	-	PSG	Nema uočene povezanosti - dob majke čimbenik rizika za PSG u djece OR = 5,32; 95 % CI 1,43 – 19,82; p=0,013	[158]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Egipat	116	51/65	-	ASD VSD PDA	Nema uočene povezanosti	[159]

Polimorfizam	Zemlja	Ispitanici			Vrsta PSG	Nalaz	Referenca
		Ispitanici	Majka	Otac			
<i>MTHFR</i> rs1801133	Egipat	-	MDS+PSG+ 25 MDS-PSG+ 35 Kontrola 61	-	ASD VSD AVSD AV kanal	Čimbenik rizika za septalne defekte u DS potomaka	[157]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131	Hrvatska	54/58	52/55	-	PSG	Nema uočene povezanosti	[160]
<i>MTHFR</i> rs1801133 rs1801131 <i>MTRR</i> rs1801294	SAD	121/122			AVSD	Češće nasljeđivanje A alela <i>MTHFR</i> rs1801131 u DS osoba s AVSD-om	[165]
<i>MTHFR</i> C677T rs1801133 rs1801131	Brazil	-	90/149	-	PSG	rs1801133 CT ili TT povećan rizik za PSG u DS potomaka OR = 2,07; 95 % CI = 1,18 – 3,61 rs1801133 CT ili TT + bez unosa folne kiseline značajan čimbenik rizika za DSPSG+ OR = 2,26; 95 % CI = 1,25 – 4,09 rs1801131 ne predstavlja čimbenik rizika	[47]

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; PSG – prirodene srčane greške; DS – Downov sindrom; MDSPSG+ – majke djece s Downovim sindromom i prirodnom srčanom greškom; MDSPSG- –majke djece s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; AV kanal – atrioventrikularni kanal; ASD – atrijski septalni defekt; AVSD – atrioventrikularni septalni defekt; VSD – ventrikularni septalni defekt; PDA – otvoreni arterijski duktus;; DSPSG+ – osobe s Downovim sindromom i prirodnom srčanom greškom; OR – Odds ratios; CL – 95% confidence intervals; *p* – vrijednost

Prilog 4. Analiza kombinacija varijanti gena

Tablica 20. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *DNMT3A* rs1550117 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

<i>DNMT1</i> rs2228611	<i>DNMT3A</i> rs1550117				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	AA	0 (0,0)	1 (0,84)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	AG	5 (3,97)	3 (2,52)	1,60 (0,37 – 6,84)	0,528
AA	GG	26 (20,63)	34 (28,57)	0,65 (0,36 – 1,17)	0,150
AG	AA	1 (0,79)	0 (0,0)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	AG	13 (10,32)	12 (10,08)	1,03 (0,45 – 2,35)	0,952
AG	GG	64 (50,79)	53 (44,54)	1,29 (0,78 – 2,13)	0,328
GG	AA	0 (0,0)	0 (0,0)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
GG	AG	3 (2,38)	2 (1,68)	1,43 (0,23 – 8,69)	0,700
GG	GG	14 (11,11)	14 (11,76)	0,94 (0,43 – 2,06)	0,872
UKUPNO		126	119		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 21. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *DNMT3B* rs1569686 u ispitanika (N=127) i kontrola (N=120)

<i>DNMT1</i> rs2228611	<i>DNMT3A</i> rs1569686				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	GG	9 (7,09)	9 (7,50)	0,94 (0,36 – 2,46)	0,901
AA	TG	18 (14,17)	24 (20,00)	0,66 (0,34 – 1,29)	0,225
AA	TT	4 (3,15)	5 (4,17)	0,75 (0,20 – 2,85)	0,671
AG	GG	31 (24,41)	28 (23,33)	1,06 (0,59 – 1,91)	0,843
AG	TG	36 (28,35)	32 (26,67)	1,09 (0,62 – 1,90)	0,768
AG	TT	12 (9,45)	6 (5,00)	1,98 (0,72 – 5,46)	0,186
GG	GG	10 (7,87)	5 (4,17)	1,97 (0,65 – 5,93)	0,230
GG	TG	6 (4,72)	8 (6,67)	0,69 (0,23 – 2,06)	0,511
GG	TT	1 (0,79)	3 (2,50)	0,31 (0,03 – 3,02)	0,313
UKUPNO		127	120		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 22. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *DNMT3B* rs2424913 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

<i>DNMT1</i> rs2228611		<i>DNMT3B</i> rs2424913			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	CC	6 (4,84)	10 (8,62)	0,54 (0,19 – 1,53)	0,247
AA	CT	15 (12,10)	21 (18,10)	0,62 (0,30 – 1,28)	0,195
AA	TT	8 (6,45)	4 (3,45)	1,93 (0,57 – 6,59)	0,294
AG	CC	27 (21,77)	20 (17,24)	1,34 (0,70 – 2,54)	0,377
AG	CT	32 (25,81)	35 (30,17)	0,81 (0,46 – 1,42)	0,452
AG	TT	19 (15,32)	10 (8,62)	1,92 (0,85 – 4,32)	0,116
GG	CC	8 (6,45)	5 (4,31)	1,53 (0,49 – 4,82)	0,467
GG	CT	5 (4,03)	10 (8,62)	0,45 (0,15 – 1,34)	0,151
GG	TT	4 (3,23)	1 (0,86)	3,83 (0,42 – 34,81)	0,233
UKUPNO		124	116		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodne srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 23. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=129) i kontrola (N=120)

<i>DNMT1</i> rs2228611		<i>MTHFR</i> rs1801133			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	CC	10 (7,75)	15 (12,50)	0,59 (0,25 – 1,37)	0,217
AA	CT	19 (14,73)	18 (15,00)	0,98 (0,49 – 1,97)	0,952
AA	TT	2 (1,55)	5 (4,17)	0,362 (0,07 – 1,90)	0,230
AG	CC	32 (24,81)	34 (28,33)	0,83 (0,48 – 1,47)	0,529
AG	CT	38 (29,46)	29 (24,17)	1,31 (0,75 – 2,30)	0,348
AG	TT	10 (7,75)	3 (2,50)	3,28 (0,88 – 12,21)	0,077
GG	CC	7 (5,43)	8 (6,67)	0,80 (0,28 – 2,29)	0,682
GG	CT	8 (6,20)	5 (4,17)	1,52 (0,48 – 4,78)	0,474
GG	TT	3 (2,33)	3 (2,50)	0,92 (0,18 – 4,65)	0,921
UKUPNO		129	120		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodne srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 24. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT1* rs2228611 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=128) i kontrola (N=120)

<i>DNMT1</i> rs2228611	<i>MTRR</i> rs1801394				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	AA	7 (5,47)	7 (5,83)	0,93 (0,32 – 2,75)	0,901
AA	AG	18 (14,06)	18 (15,00)	0,93 (0,46 – 1,88)	0,834
AA	GG	6 (4,69)	13 (10,83)	0,40 (0,15 – 1,10)	0,077
AG	AA	19 (14,84)	12 (10,00)	1,57 (0,73 – 3,39)	0,252
AG	AG	41 (32,03)	41 (34,17)	0,91 (0,53 – 1,54)	0,721
AG	GG	20 (15,63)	13 (10,83)	1,52 (0,72 – 3,22)	0,269
GG	AA	3 (2,34)	3 (2,50)	0,94 (0,19 – 4,73)	0,936
GG	AG	10 (7,81)	11 (9,17)	0,84 (0,34 – 2,06)	0,702
GG	GG	4 (3,13)	2 (1,67)	1,90 (0,34 – 10,57)	0,462
UKUPNO		128	120		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTRR* – 5-metilтетраhydrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 25. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *DNMT3B* rs1569686 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

<i>DNMT3A</i> rs1550117	<i>DNMT3B</i> rs1569686				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	GG	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	TG	1 (0,79)	1 (0,84)	0,94 (0,06 – 15,27)	0,968
AA	TT	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	GG	7 (5,56)	8 (6,72)	0,82 (0,29 – 2,33)	0,704
AG	TG	11 (8,73)	6 (5,04)	1,80 (0,64 – 5,04)	0,262
AG	TT	3 (2,38)	3 (2,52)	0,94 (0,19 – 4,77)	0,944
GG	GG	42 (33,33)	33 (27,73)	1,30 (0,75 – 2,25)	0,342
GG	TG	48 (38,10)	57 (47,90)	0,67 (0,40 – 1,11)	0,122
GG	TT	14 (11,11)	11 (9,24)	1,23 (0,53 – 2,82)	0,630
UKUPNO		126	119		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 26. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *MTHFR* rs1801133 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

<i>DNMT3A</i> rs1550117	<i>MTHFR</i> rs1801133				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	CT	1 (0,79)	1 (0,84)	0,94 (0,06 – 15,27)	0,968
AA	TT	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	CC	10 (7,94)	7 (5,88)	1,38 (0,51 – 3,75)	0,529
AG	CT	8 (6,35)	7 (5,88)	1,08 (0,38 – 3,09)	0,879
AG	TT	3 (2,38)	3 (2,52)	0,94 (0,19 – 4,77)	0,944
GG	CC	38 (30,16)	49 (41,18)	0,62 (0,36 – 1,05)	0,073
GG	CT	54 (42,86)	44 (36,97)	1,28 (0,77 – 2,14)	0,348
GG	TT	12 (9,52)	8 (6,72)	1,46 (0,58 – 3,71)	0,426
UKUPNO		126	119		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 27. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *MTHFR* rs1801131 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

<i>DNMT3A</i> rs1550117	<i>MTHFR</i> rs1801131				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	AA	0 (0,00)	1 (0,84)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	AC	1 (0,79)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	CC	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	AA	13 (10,32)	9 (7,56)	1,41 (0,58 – 3,42)	0,453
AG	AC	7 (5,56)	8 (6,72)	0,82 (0,29 – 2,33)	0,704
AG	CC	1 (0,79)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
GG	AA	60 (47,62)	43 (36,13)	1,61 (0,96 – 2,68)	0,070
GG	AC	42 (33,33)	54 (45,38)	0,60 (0,36 – 1,01)	0,054
GG	CC	2 (1,59)	4 (3,36)	0,46 (0,08 – 2,58)	0,380
UKUPNO		126	119		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodene srčane greške; *MTHFR* – metilentetrahidrofolat reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 28. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3A* rs1550117 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=126) i kontrola (N=119)

<i>DNMT3A</i> rs1550117	<i>MTRR</i> rs1801394				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	AG	1 (0,79)	1 (0,84)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AA	GG	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG	AA	4 (3,17)	1 (0,84)	3,87 (0,43 – 35,12)	0,229
AG	AG	14 (11,11)	14 (11,76)	0,94 (0,43 – 2,06)	0,872
AG	GG	3 (2,38)	2 (1,68)	1,43 (0,23 – 8,69)	0,700
GG	AA	24 (19,05)	21 (17,65)	1,10 (0,57 – 2,10)	0,777
GG	AG	53 (42,06)	54 (45,38)	0,87 (0,53 – 1,45)	0,601
GG	GG	27 (21,43)	26 (21,85)	0,98 (0,53 – 1,79)	0,936
UKUPNO		126	119		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodne srčane greške; *MTRR* – 5-metilтетраhydrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 29. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs1569686 i *DNMT3B* rs2424913 u ispitanika (N=124) i kontrola (N=116)

<i>DNMT3B</i> rs1569686	<i>DNMT3B</i> rs2424913				
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	CC	33 (26,61)	30 (25,86)	1,04 (0,58 – 1,85)	0,895
GG	CT	10 (8,06)	6 (5,17)	1,61 (0,57 – 4,58)	0,373
GG	TT	6 (4,84)	6 (5,17)	0,93 (0,29 – 2,98)	0,906
TG	CC	2 (1,61)	4 (3,45)	0,46 (0,08 – 2,55)	0,374
TG	CT	41 (33,06)	52 (44,83)	0,61 (0,36 – 1,03)	0,062
TG	TT	15 (12,10)	6 (5,17)	2,52 (0,94 – 6,74)	0,065
TT	CC	6 (4,84)	1 (0,86)	5,85 (0,69 – 49,33)	0,105
TT	CT	1 (0,81)	8 (6,90)	0,11 (0,01 – 0,89)	0,039
TT	TT	10 (8,06)	3 (2,59)	3,30 (0,89 – 12,32)	0,075
UKUPNO		124	116		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirodne srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 30. Učestalost kombinacije genotipova *DNMT3B* rs1569686 i *MTRR* rs1801394 u ispitanika (N=130) i kontrola (N=124)

<i>DNMT3B</i> rs1569686		<i>MTRR</i> rs1801394			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	AA	15 (11,54)	9 (7,26)	1,67 (0,70 – 3,96)	0,248
GG	AG	24 (18,46)	25 (20,16)	0,90 (0,48 – 1,67)	0,732
GG	GG	11 (8,46)	11 (8,87)	0,95 (0,40 – 2,28)	0,908
TG	AA	14 (10,77)	12 (9,68)	1,13 (0,50 – 2,54)	0,774
TG	AG	32 (24,62)	37 (29,84)	0,77 (0,44 – 1,34)	0,350
TG	GG	17 (13,08)	16 (12,90)	1,02 (0,49 – 2,11)	0,967
TT	AA	2 (1,54)	2 (1,61)	0,95 (0,13 – 6,87)	0,962
TT	AG	13 (10,00)	10 (8,06)	1,22 (0,52 – 2,90)	0,645
TT	GG	2 (1,54)	2 (1,61)	0,95 (0,13 – 6,87)	0,962
UKUPNO		130	124		

DNMT – DNK metiltransferaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške; *MTRR* – 5-metiltetrahydrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 31. Učestalost kombinacije genotipova *MTHFR* rs1801133 i *MTRR* rs1801394 u u ispitanika (N=133) i kontrola (N=124)

<i>MTHFR</i> rs1801133		<i>MTRR</i> rs1801394			
Genotip		DSPSG+ N (%)	DSPSG- (N%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	AA	11 (8,27)	10 (8,06)	1,03 (0,42 – 2,51)	0,952
CC	AG	26 (19,55)	32 (25,81)	0,70 (0,39 – 1,26)	0,232
CC	GG	13 (9,77)	16 (12,90)	0,73 (0,34 – 1,59)	0,430
CT	AA	18 (13,53)	12 (9,68)	1,46 (0,67 – 3,17)	0,338
CT	AG	36 (27,07)	32 (25,81)	1,07 (0,61 – 1,86)	0,819
CT	GG	14 (10,53)	11 (8,87)	1,21 (0,53 – 2,77)	0,655
TT	AA	3 (2,26)	1 (0,81)	2,84 (0,29 – 27,66)	0,369
TT	AG	8 (6,02)	8 (6,45)	0,93 (0,34 – 2,55)	0,885
TT	GG	4 (3,01)	2 (1,61)	1,89 (0,34 – 10,51)	0,467
UKUPNO		133	124		

MTHFR – metilentetrahydrofolat reduktaza; *MTRR* – 5-metiltetrahydrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; DSPSG+ osobe s Downovim sindromom i prirođenom srčanom greškom; DSPSG- osobe s Downovim sindromom bez prirođene srčane greške; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Prilog 5. Povezanost varijanti gena *MTHFR*, *MTRR* i *DNMT* s vrstom prirodne srčane greške kod osoba s Downovim sindromom

Tablica 43. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT1* rs2228611 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 31) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 98)

<i>DNMT 1</i> rs2228611		DSAVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	9 (29,03)	22 (22,45)	0,56	1,41 (0,57 – 3,51)	0,455
AG		19 (61,29)	61 (62,24)	0,01	0,96 (0,42 – 2,20)	0,924
GG		3 (9,68)	15 (15,31)	0,24	0,59 (0,16 – 2,20)	0,560
A	Alel	37 (59,68)	105 (53,57)	0,71	1,28 (0,2 – 2,9)	0,399
G		25 (40,32)	91 (46,43)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,24	1,69 (0,45 – 6,26)	0,560
		AA vs AG + GG		0,56	1,41 (0,57 – 3,51)	0,455
		AA vs GG		0,39	2,05 (0,47 – 8,83)	0,494
		AA vs AG		0,33	1,31 (0,52 – 3,33)	0,565
		GG vs AG		0,11	0,64 (0,17 – 2,46)	0,756

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 44. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT1* rs2228611 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 30) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 99)

<i>DNMT 1</i> rs2228611		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	4 (13,33)	27 (27,27)	1,75	0,41 (0,13 – 1,29)	0,147
AG		23 (76,67)	57 (57,58)	3,56	2,42 (0,95 – 6,17)	0,059
GG		3 (10,00)	15 (15,15)	0,17	0,62 (0,17 – 2,31)	0,564
A	Alel	31 (51,67)	111 (56,06)	0,36	0,84 (0,47 – 1,49)	0,549
G		29 (48,33)	87 (43,94)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,17	1,61 (0,43 – 5,96)	0,564
		AA vs AG + GG		1,75	0,41 (0,13 – 1,29)	0,147
		AA vs GG		0,00	0,74 (0,15 – 3,76)	0,697
		AA vs AG		2,25	0,37 (0,12 – 1,17)	0,091
		GG vs AG		0,57	0,50 (0,13 – 1,88)	0,384

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 45. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT1* rs2228611 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 46) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 83)

<i>DNMT1</i> rs2228611		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	13 (28,26)	18 (21,69)	0,70	1,42 (0,62 – 3,25)	0,402
AG		25 (54,35)	55 (66,27)	1,78	0,61 (0,29 – 1,27)	0,182
GG		8 (17,39)	10 (12,05)	0,70	1,54 (0,56 – 4,22)	0,401
A	Alel	51 (55,43)	91 (54,82)	0,01	1,03 (0,61 – 1,71)	0,924
G		41 (44,57)	75 (45,18)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,70	0,65 (0,24 – 1,78)	0,401
		AA vs AG + GG		0,70	1,42 (0,62 – 3,25)	0,402
		AA vs GG		0,03	0,90 (0,28 – 2,91)	0,865
		AA vs AG		1,13	1,59 (0,68 – 3,74)	0,287
		GG vs AG		1,15	1,76 (0,62 – 4,99)	0,285

DNMT1 – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 46. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3A* rs1550117 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 30) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 96)

<i>DNMT3A</i> rs1550117		DSAVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	0 (0,00)	1 (1,04)	0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG		5 (16,67)	16 (16,67)	0,00	1,00 (0,33 – 3,0)	1,000
GG		25 (83,33)	79 (82,29)	0,02	1,08 (0,36 – 3,21)	0,896
A	Alel	5 (8,33)	18 (9,38)	0,06	0,88 (0,31 – 2,48)	0,807
G		55 (91,67)	174 (90,63)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,02	0,93 (0,31 – 2,76)	0,896
		AA vs AG + GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs AG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		GG vs AG		0,00	1,01 (0,34 – 3,04)	0,982

DNMT3A – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 47. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3A* rs1550117 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 29) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 97)

<i>DNMT3A</i> rs1550117		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	0 (0,00)	1 (1,03)	0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG		4 (13,79)	17 (17,53)	0,04	0,74 (0,23 – 2,42)	0,780
GG		25 (86,21)	79 (81,44)	0,10	1,42 (0,44 – 4,60)	0,781
A	Alel	4 (6,90)	19 (9,79)	0,17	0,68 (0,22 – 2,09)	0,611
G		54 (93,10)	175 (90,21)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,10	0,70 (0,22 – 2,27)	0,781
		AA vs AG + GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs AG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		GG vs AG		0,04	1,34 (0,41 – 4,37)	0,780

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 48. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3A* rs1550117 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 45) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 81)

<i>DNMT3A</i> rs1550117		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	1 (2,22)	0 (0,00)	0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
AG		7 (15,56)	14 (17,28)	0,06	0,88 (0,33 – 2,37)	0,803
GG		37 (82,22)	67 (82,72)	0,00	0,97 (0,37 – 2,52)	0,944
A	Alel	9 (10,00)	14 (8,64)	0,13	1,17 (0,49 – 2,83)	0,720
G		81 (90,00)	148 (91,36)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,00	1,03 (0,40 – 2,69)	0,944
		AA vs AG + GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs GG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs AG		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		GG vs AG		0,04	1,10 (0,41 – 2,98)	0,844

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 49. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs1569686 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 5) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 87)

<i>DNMT3B</i> rs1569686		DSAVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	Genotip	1 (20,00)	31 (35,63)	0,05	0,45 (0,05 – 4,22)	0,655
TG		2 (40,00)	36 (41,38)	0,16	0,94 (0,15 – 5,94)	1,000
TT		2 (40,00)	20 (22,99)	0,11	2,23 (0,35 – 14,31)	0,590
G	Alel	4 (40,00)	98 (56,32)	0,47	0,52 (0,14 – 1,90)	0,345
T		6 (60,00)	76 (43,68)			
Genetički model		GG + TG vs TT		0,11	0,48 (0,07 – 2,87)	0,590
		GG vs TG + TT		0,11	2,23 (0,35 – 14,31)	0,590
		GG vs TT		0,11	0,32 (0,03 – 3,80)	0,560
		GG vs TG		0,02	0,58 (0,05 – 6,72)	1,000
		TT vs TG		0,00	1,80 (0,24 – 13,77)	0,619

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 50. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs1569686 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 10) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 82)

<i>DNMT3B</i> rs1569686		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	Genotip	5 (50,00)	27 (32,93)	1,15	2,04 (0,54 – 7,64)	0,292
TG		3 (30,00)	35 (42,68)	0,18	0,56 (0,14 – 2,38)	0,516
TT		2 (20,00)	20 (24,39)	0,01	0,78 (0,15 – 3,95)	1,000
G	Alel	13 (65,00)	89 (54,27)	0,83	1,57 (0,59 – 4,12)	0,365
T		7 (35,00)	75 (45,73)			
Genetički model		GG + TG vs TT		0,01	1,29 (0,25 – 6,58)	1,000
		GG vs TG + TT		1,15	2,04 (0,54 – 7,64)	0,292
		GG vs TT		0,08	1,85 (0,33 – 10,54)	0,687
		GG vs TG		0,40	2,16 (0,47 – 9,85)	0,455
		TT vs TG		0,10	1,17 (0,18 – 7,58)	1,000

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 51. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs1569686 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 31) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 61)

<i>DNMT3B</i> rs1569686		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
GG	Genotip	11 (35,48)	21 (34,43)	0,01	1,05 (0,42 – 2,59)	0,920
TG		15 (48,39)	23 (37,70)	0,97	1,55 (0,65 – 3,71)	0,327
TT		5 (16,13)	17 (27,87)	1,56	0,50 (0,16 – 1,51)	0,218
G	Alel	37 (59,68)	65 (53,28)	0,68	1,30 (0,70 – 2,41)	0,410
T		25 (40,32)	57 (46,72)			
Genetički model		GG + TG vs TT		1,56	2,01 (0,66 – 6,09)	0,218
		GG vs TG + TT		0,01	1,05 (0,42 – 2,59)	0,920
		GG vs TT		0,85	1,78 (0,52 – 6,13)	0,360
		GG vs TG		0,19	0,80 (0,30 – 2,13)	0,660
		TT vs TG		1,76	0,45 (0,14 – 1,48)	0,190

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 52. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs2424913 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 30) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 95)

<i>DNMT3B</i> rs2424913		AVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	Genotip	12 (40,00)	29 (30,53)	0,93	1,52 (0,65 – 3,55)	0,337
CT		10 (33,33)	43 (45,26)	1,33	0,60 (0,26 – 1,43)	0,252
TT		8 (26,67)	23 (24,21)	0,22	1,25 (0,49 – 3,22)	0,641
C	Alel	34 (56,67)	101 (53,16)	0,23	1,15 (0,64 – 2,07)	0,635
T		26 (43,33)	89 (46,84)			
Genetički model		CC+CT vs TT		0,07	0,88 (0,34 – 2,24)	0,786
		CC vs CT+TT		0,93	1,52 (0,65 – 3,55)	0,337
		CC vs TT		0,11	1,19 (0,42 – 3,40)	0,746
		CC vs CT		1,39	1,78 (0,68 – 4,66)	0,241
		TT vs CT		0,56	1,50 (0,52 – 4,31)	0,456

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 53. Učestalost i povezanost varijante gena *DNMT3B* rs2424913 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 29) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 96)

<i>DNMT3B</i> rs2424913		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	Genotip	8 (27,59)	33 (34,38)	0,47	0,73 (0,29 – 1,82)	0,496
CT		16 (55,17)	37 (38,54)	2,52	1,96 (0,85 – 4,54)	0,115
TT		5 (17,24)	26 (27,08)	1,16	0,56 (0,19 – 1,62)	0,287
C	Alel	32 (55,17)	103 (53,65)	0,04	1,06 (0,59 – 1,92)	0,838
T		26 (44,83)	89 (46,35)			
Genetički model		CC+CT vs TT		1,16	1,78 (0,62 – 5,16)	0,287
		CC vs CT+TT		0,47	0,73 (0,29 – 1,82)	0,496
		CC vs TT		0,14	1,26 (0,37 – 4,31)	0,712
		CC vs CT		1,39	0,56 (0,21 – 1,48)	0,242
		TT vs CT		2,06	0,44 (0,14 – 1,37)	0,157

DNMT – DNK metiltransferaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 54. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801133 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 31) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 103)

<i>MTHFR</i> rs1801133		DSAVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	Genotip	13 (41,94)	37 (35,92)	0,37	1,29 (0,57 – 2,92)	0,544
CT		16 (51,61)	53 (51,46)	0,00	1,01 (0,45 – 2,25)	0,988
TT		2 (6,45)	13 (12,62)	0,91	0,48 (0,10 – 2,24)	0,349
C	Alel	42 (67,74)	127 (61,65)	0,76	1,31 (0,72 – 2,39)	0,384
T		20 (32,26)	79 (38,35)			
Genetički model		CC+CT vs TT		0,40	2,09 (0,45 – 9,83)	0,275
		CC vs CT+TT		0,37	1,29 (0,57 – 2,92)	0,544
		CC vs TT		0,45	2,28 (0,45 – 11,51)	0,258
		CC vs CT		0,12	1,16 (0,50 – 2,71)	0,725
		TT vs CT		0,25	0,51 (0,10 – 2,50)	0,323

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 55. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801133 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 31) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 103)

<i>MTHFR</i> rs1801133		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
CC	Genotip	13 (41,94)	37 (35,92)	0,37	1,29 (0,57 – 2,92)	0,544
CT		12 (38,71)	57 (55,34)	2,64	0,51 (0,22 – 1,16)	0,107
TT		6 (19,35)	9 (8,74)	2,70	2,51 (0,82 – 7,71)	0,109
C	Alel	38 (61,29)	131 (63,59)	0,11	0,91 (0,51 – 1,63)	0,742
T		24 (38,71)	75 (36,41)			
Genetički model		CC+CT vs TT		2,70	0,40 (0,13 – 1,23)	0,109
		CC vs CT+TT		0,37	1,29 (0,57 – 2,92)	0,544
		CC vs TT		1,09	0,53 (0,16 – 1,77)	0,300
		CC vs CT		1,29	1,67 (0,69 – 4,05)	0,258
		TT vs CT		3,74	3,17 (0,95 – 10,58)	0,061

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 56. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801131 kod osoba s Downovim sindromom i atrioventrikularnim septalnim defektom (DSAVSD) (N = 31) i atrijskim i ventrikularnim septalnim defektom (DS ASD/VSD) (N = 103)

<i>MTHFR</i> rs1801131		DSAVSD N (%)	DS ASD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	18 (58,06)	58 (56,31)	0,03	1,07 (0,48 – 2,42)	0,863
AC		12 (38,71)	43 (41,75)	0,09	0,88 (0,39 – 2,00)	0,763
CC		1 (3,23)	2 (1,94)	0,07	1,68 (0,15 – 19,21)	0,549
A	Alel	48 (77,42)	159 (77,18)	0,00	1,01 (0,51 – 2,00)	0,969
C		14 (22,58)	47 (22,82)			
Genetički model		AA + AC vs. CC		0,07	0,59 (0,05 – 6,78)	0,549
		AA vs AC + CC		0,03	1,07 (0,48 – 2,42)	0,863
		AA vs. CC		0,09	0,62 (0,05 – 7,25)	0,567
		AA vs. AC		0,06	1,11 (0,48 – 2,55)	0,802
		CC vs. AC		0,06	1,79 (0,15 – 21,49)	0,540

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 57. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801131 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 31) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 103)

<i>MTHFR</i> rs1801131		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	15 (48,39)	61 (59,22)	1,14	0,65 (0,29 – 1,45)	0,288
AC		16 (51,61)	39 (37,86)	1,86	1,75 (0,78 – 3,93)	0,175
CC		0 (0,00)	3 (2,91)	0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
A	Alel	46 (74,19)	161 (78,16)	0,43	0,80 (0,42 – 1,55)	0,515
C		16 (25,81)	45 (21,84)			
Genetički model		AA + AC vs. CC		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs AC + CC		1,14	0,65 (0,29 – 1,45)	0,288
		AA vs. CC		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000
		AA vs. AC		1,55	0,60 (0,27 – 1,35)	0,216
		CC vs. AC		0,00	0,00 (0,00 – 0,00)	0,000

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 58. Učestalost i povezanost varijante gena *MTHFR* rs1801131 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 49) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 85)

<i>MTHFR</i> rs1801131		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	30 (61,22)	46 (54,12)	0,64	1,34 (0,65 – 2,74)	0,424
AC		18 (36,73)	37 (43,53)	0,59	0,75 (0,37 – 1,55)	0,442
CC		1 (2,04)	2 (2,35)	0,24	0,86 (0,08 – 9,79)	0,698
A	Alel	78 (79,59)	129 (75,88)	0,49	1,24 (0,68 – 2,27)	0,486
C		20 (20,41)	41 (24,12)			
Genetički model		AA + AC vs. CC		0,24	1,16 (0,10 – 13,09)	0,698
		AA vs AC + CC		0,64	1,34 (0,65 – 2,74)	0,424
		AA vs. CC		0,15	1,30 (0,11 – 15,03)	0,661
		AA vs. AC		0,63	1,34 (0,65 – 2,77)	0,430
		CC vs. AC		0,37	1,03 (0,09 – 12,10)	0,704

MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 59. Učestalost i povezanost varijante gena *MTRR* rs1801394 kod osoba s Downovim sindromom i ventrikularnim septalnim defektom (VSD) (N = 31) i atrioventrikularnim i atrijskim septalnim defektom (DS AVSD/ASD) (N = 102)

<i>MTRR</i> rs1801394		DSVSD N (%)	DS AVSD/ASD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	9 (29,03)	23 (22,55)	0,55	1,41 (0,57 – 3,47)	0,461
AG		15 (48,39)	54 (52,94)	0,20	0,83 (0,37 – 1,86)	0,657
GG		7 (22,58)	25 (24,51)	0,05	0,90 (0,35 – 2,34)	0,826
A	Alel	33 (53,23)	100 (49,02)	0,34	1,18 (0,67 – 2,09)	0,562
G		29 (46,77)	104 (50,98)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,05	1,11 (0,43 – 2,89)	0,826
		AA vs AG + GG		0,55	1,41 (0,57 – 3,47)	0,461
		AA vs GG		0,33	1,40 (0,45 – 4,36)	0,565
		AA vs AG		0,49	1,41 (0,54 – 3,68)	0,484
		GG vs AG		0,00	1,01 (0,37 – 2,78)	0,988

MTRR – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

Tablica 60. Učestalost i povezanost varijante gena *MTRR* rs1801394 kod osoba s Downovim sindromom s atrijskim septalnim defektom (DSASD) (N = 49) i atrioventrikularnim i ventrikularnim septalnim defektom (DS AVSD/VSD) (N = 84)

<i>MTRR</i> rs1801394		DSASD N (%)	DS AVSD/VSD N (%)	χ^2	OR (95% CI)	<i>p</i>
AA	Genotip	13 (26,53)	19 (22,62)	0,26	1,24 (0,55 – 2,79)	0,611
AG		25 (51,02)	44 (52,38)	0,02	0,95 (0,47 – 1,92)	0,880
GG		11 (22,45)	21 (25,00)	0,11	0,87 (0,38 – 2,00)	0,740
A	Alel	51 (52,04)	82 (48,81)	0,26	1,14 (0,69 – 1,87)	0,611
G		47 (47,96)	86 (51,19)			
Genetički model		AA+AG vs GG		0,11	1,15 (0,50 – 2,65)	0,740
		AA vs AG + GG		0,26	1,24 (0,55 – 2,79)	0,611
		AA vs GG		0,27	1,31 (0,47 – 3,60)	0,606
		AA vs AG		0,18	1,20 (0,51 – 2,84)	0,672
		GG vs AG		0,03	0,92 (0,38 – 2,22)	0,856

MTRR – 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferasa reduktaza; χ^2 – Hi-kvadrat test; *p* – vrijednost; OR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Dijana Majstorović
Adresa	Zagrebačka 30, 52 100 Pula
Telefon	+385 (52) 877 425
Mobitel	+385 99 377 7465
E-pošta	dijanamajstorovic@unipu.hr
URL	https://mfpu.unipu.hr/mfpu/dijana.majstorovic
Državljanstvo	hrvatsko
Datum rođenja	6. kolovoza 1977.

RADNO ISKUSTVO

Datum	1. lipanj 2017. – ...
Ustanova zaposlenja	Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Medicinski fakultet u Puli
Naziv radnog mjesta	viši predavač voditeljica stručnog prijediplomskog studija Sestrinstvo v.d. voditeljice sveučilišnog diplomskog studija Sestrinstvo
	1. rujan 2012. – 31. svibanj 2017
	Dom za starije osobe Raša
	prvostupnica sestrinstva, voditeljica odjela zdravstvene njege i brige, glavna medicinska sestra
	1. rujan 1997. – 31. kolovoz 2012.
	Istarski domovi zdravlja – Ispostava Labin
	medicinska sestra

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

• Datum	2017. – ...
• Ustanova	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
• Zvanje	Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biomedicina
	2014. – 2017.
	Sveučilište u Rijeci, Filozofski fakultet
	Razlikovni modul za stjecanje uvjeta za upis na Poslijediplomski studij iz psihologije
	2011. – 2013.
	Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet
	Sveučilišni diplomski studij Sestrinstvo
	magistra sestrinstva
	2010. – 2011.
	Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
	Program stjecanja nastavničkih kompetencija

USAVRŠAVANJE

2007. – 2010.
Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Preddiplomski stručni studij Sestrinstvo
prvostupnica sestrinstva
1993. – 1996.
Medicinska škola Pula
Srednja škola
medicinska sestra
2017.
Nastavničke kompetencije u visokom obrazovanju
2018. / 2021. / 2022.
Usavršavanje nastavničkih kompetencija za visokoškolske nastavnike
2023.
University of Pisa, Medical School, Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery (Erasmus+ Mobility)

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE**MATERINJI JEZIK
DRUGI JEZICI**

Hrvatski
Engleski

**SOCIJALNE VJEŠTINE I
SPOSOBNOSTI**

komunikacijske vještine stečene tijekom formalnog i neformalnog obrazovanja i rada s pacijentima, suradnicima i studentima, suradnja s nastavnim bazama

**ORGANIZACIJSKE
VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI**

organizacija rada odjela, voditeljstvo studijskih programa, rad na projektima i različitim odborima/povjerenstvima, kliničke / terenske nastave

**TEHNIČKE VJEŠTINE I
SPOSOBNOSTI**

efikasno korištenje računala, interneta i korisničkih alata Microsoft Office paketa, pretraživanje baza podataka

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija

DODATNE OBAVIJESTI

SURADNIK NA PROJEKTIMA

1. Razina metilacije *MTHFR* gena u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba s Downovim sindromom - uniri-iskusni-biomed-23-152, voditelj projekta: izv.prof.dr.sc. Jadranka Vraneković – trenutno
2. Communication skills and diversity competence for students of vocational Schools for Medical Professions: Design thinking for participatory medicine (u okviru programa Erasmus+)
3. Razvoj i unaprjeđenje studijskih programa sukladno HKO – u na Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli
4. Epigenetički i genetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u osoba sa sindromom Down - uniri-biomed-18-230,1393, Glavni istraživač: doc.dr.sc. Jadranka Vraneković
5. Proučavanje kolonizacije bakterija u novoj Općoj bolnici Pula i njihove potencijalne povezanosti s bolničkim infekcijama; Institucijski projekt Odjela za prirodne i zdravstvene studije Sveučilišta u Puli, Glavni istraživač: doc.dr.sc. Emina Pustijanac

OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADVI

1. Milić J, Skitarelić N, **Majstorović D**, Zoranić S, Čivljak M, Ivanišević K i sur. Levels of depression, anxiety and subjective happiness among health sciences students in Croatia: a multi-centric cross-sectional study. *BMC Psychiatry* 2024;24:50.
2. **Majstorović D**, Barišić A, Vraneković J. Genetički čimbenici u etiologiji prirođenih srčanih grešaka u Downovom sindromu. *Medicina Fluminensis* 2023;59:257-264.
3. Barišić A, Ravančić ME, **Majstorović D**, Vraneković J. Micronutrient status in children and adolescents with Down syndrome: systematic review and meta-analysis. *J Intellect Disabil Res* 2023;67:701-719.
4. **Majstorović D**, Barišić A, Božović IB, Čače IB, Čače N, Štifanić M, Vraneković J. *DNMT3B* rs2424913 as a Risk Factor for Congenital Heart Defects in Down Syndrome. *Genes (Basel)* 2023;14:576.
5. Pustijanac E, Hrenović J, Vranić-Ladavac M, Močenić M, Karčić N, Lazarić Stefanović L, Hrčić I, Lončarić J, Šeruga Musić M, Drčelić M, **Majstorović D**, Kovačić I. Dissemination of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate to Hospital Environment during the COVID-19 Pandemic. *Pathogens* 2023; 12:410.
6. **Majstorović D**, Barišić A, Štifanić M, Dobrača I, Vraneković J. The Importance of Genomic Literacy and Education in Nursing. *Front Genet* 2021;12:759950.
7. Puljak L, Čivljak M, Haramina A, Mališa S, Čavić D, Klinec D, Aranza D, Mesarić J, Skitarelić N, Zoranić S, **Majstorović D**, Neuberger M, Mikšić Š, Ivanišević K. Attitudes and concerns of undergraduate university health sciences students in Croatia regarding complete switch to e-learning during COVID-19 pandemic: a survey. *BMC Med Educ* 2020;20:416.
8. Vraneković, J., Slivšek, G., **Majstorović, D.** Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase gene and congenital heart defects in Down syndrome. *Genetics&Application* 2020;4:12-17

POGLAVLJE U KNJIGAMA

1. The Importance of Genomic Literacy and Education in Nursing. **Majstorović, Dijana**; Barišić, Anita; Štifanić, Mauro; Dobrača, Igor; Vraneković, Jadranka. Poglavljia u knjigama, 2022.

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. **Majstorović D**, Barišić A, Stoccoro A, Nicoli V, Giangreco M, Coppedè F, Vraneković J. Correlation of methylation status in the *MTHFR* promoter region with Congenital Heart Defects in Down syndrome. Science and us. 2nd Biomedicine and Health Ph.D. Students Congress. University of Rijeka, Faculty of Medicine. 16-18. 2024. Book of Abstracts. 110.
2. Zoranić S. Puljak L. Kraljić K, Mijoč V, Čargo M, Barčot O, Čivljak M, Marendić M, Sapunar D, Vukša A, Radošević T, Novak D, Međaković J, Ivanišević K, Puharić Z, Skitarelić N, **Majstorović D**, Neuberger M, Čukljek S, Racz A. Study design and journal publication of results of theses defended in health

- sciences studies in Croatia: a retrospective cohort and cross-sectional study. 7th emergency medicine congress of nurses and medical technicians 2023.
3. **Majstorović, Dijana**, Ivanović, Luka, Jurjević, Karlo, Teofilović, Anja, Tomašević, Diana, Trajkovski Katarina, Zurta Anamaria. Standardizirani operativni postupci u zdravstvenoj njezi, standardizirani ili ne? / *Global trends in nursing and healthcare - knjiga sažetaka* / Zagreb, 2022. str. 20-20.
 4. **Majstorović, Dijana**; Dukmenić, Lorena; Jurić, Tatjana; Mik, Kristina; Vuk, Katarina; Dobrača, Igor. Proces zdravstvene njege na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli // *Global trends in nursing and healthcare - knjiga sažetaka*. Opatija, Hrvatska, 2022. str. 28-28.
 5. **Majstorović, Dijana**; Dobrača, Igor. Obrazovanje u području palijativne skrbi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli // *Konačni program i knjiga sažetaka*. Pula, Hrvatska, 2022. str. 51-51.
 6. Dobrača, Igor; **Majstorović, Dijana**. Radovi na temu palijativne skrbi u hrvatskim sestričkim časopisima na portalu Hrčak // *Konačni program i knjiga sažetaka*. Pula, 2022. str. 66-66.
 7. Damjanović, Delita; **Majstorović, Dijana**; Dobrača, Igor. Intervencije za sprečavanje padova u domovima za starije osobe // *I. virtualna studentska konferencija Medicinskog fakulteta u Puli* Pula, Hrvatska, 2022. 20.
 8. Hristovska, Teodora; **Majstorović, Dijana**; Dobrača, Igor. Didaktički materijali u obrazovanju starijih osoba // *I. virtualna studentska konferencija Medicinskog fakulteta u Puli*. Pula, Hrvatska, 2022. 19.
 9. **Majstorović, Dijana**; Barišić, Anita; Vraneković, Jadranka. DNMT3B rs2424913 as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome // *12th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine*. Dubrovnik, Hrvatska, 2022. str. 168-168
 10. Barišić, Anita; Ergović Ravančić, Maja; **Majstorović, Dijana**; Vraneković, Jadranka. Micro and macronutrient profile in Down syndrome children and adolescents: systematic review and meta-analysis // *12th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine*. Dubrovnik, Hrvatska, 2022. str. 162-162
 11. **Majstorović, D.**, Barišić, A., Bilić-Čače, I., Štifanić, M., Vraneković, J. (2021) Functional DNMT3B promoter polymorphism (rs1569686) and risk for congenital heart defects in Down syndrome. 2nd Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina.
 12. Vraneković, J., Barišić, A., **Majstorović, D.**, Babić Božović, I., Bilić Čače, I, Brajenović Milić, B. (2021) DNA METHYLTRANSFERASE GENES AND CONGENITAL HEART DEFECTS IN DOWN SYNDROME. 13th European Cytogenomics Conference.
 13. **Majstorović, Dijana**; Dobrača, Igor; Crnjin Đurić, Vanja; Alavanja, Antonela. Intervencije za unapređenje palijativne skrbi u ustanovama za starije i nemoćne osobe // *4. konferencija o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem "Izvršnost u palijativnoj skrbi"* Poreč, Hrvatska, 2019.
 14. Dobrača, Igor; **Majstorović, Dijana**; Štifanić, Mauro. Standardi zanimanja u sestričstvu u Republici Hrvatskoj // *Zbornik sažetaka 7. simpozija medicinskih sestara/tehničara s međunarodnim sudjelovanjem „Kompetencije medicinskih sestara/tehničara“*, Mostar: Sveučilišna klinička bolnica Mostar; Fakultet zdravstvenih studija Sveučilišta u Mostaru, 2019. str. 11-11.
 15. **Majstorović, Dijana**; Dobrača, Igor; Ožbolt, Nikolina; Simić, Ljerka; Subašić, Ana. E-učenje putem portala Hrvatske komore medicinskih sestara // *Global Nursing and Healthcare* Opatija, Hrvatska, 2019. str. 65-65
 16. Dobrača, Igor; Rubil, Vlatka; Bubalo, Marija; Koporčić, Valentina; Lozić, Katarina; Đapić, Valeria; **Majstorović, Dijana**. Uloga medicinske sestre u timskom radu // *Global Nursing and Healthcare* Opatija, Hrvatska, 2019. str. 97-97.
 17. **Majstorović, Dijana**; Vraneković, Jadranka; Štifanić, Mauro. Važnost edukacije o medicinskoj genetici u sestričstvu // *Suvremeno sestričstvo* / Osijek: Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2018. str. 110-110.
 18. **Majstorović, Dijana**; Humbal, Josip; Korent, Katarina; Zeman, Josip; Štifanić, M; Gavrilović Ana. Analiza studentskog znanja o dobroj higijenskoj praksi // *Obrazovanje i istraživanje za kvalitetnu zdravstvenu praksu*. Zagreb, 2018. str. 65-65.
 19. **Majstorović, Dijana**; Pustijanac, Emina; Bekčec, Ružica Stefani; Đapić, Valeria; Ožbolt, Nikolina; Simić, Ljerka. Izborni kolegiji na preddiplomskom studiju sestričstva u Republici Hrvatskoj // *Obrazovanje i istraživanje za kvalitetnu zdravstvenu praksu* Zagreb, 2018. str. 39-39.
 20. **Majstorović, Dijana**; Pustijanac, E; Alavanja, Antonela; Brenko, Svetlana; Hasanbašić, Una; Analiza sadržaja iz palijativne skrbi u udžbenicima zdravstvene njege // *3. konferencija o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem Palijativna skrb u zajednici - Hrvatska i Europska iskustva* Pula, Hrvatska, 2018. str. 57-57.

21. Ružica, Stefani, Bekčec; Korent, Katarina; Brezak, Andrea; **Majstorović, Dijana**. Palijativna skrb u medijima // 3. konferencija o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem Palijativna skrb u zajednici - Hrvatska i Europska iskustva Pula, Hrvatska. str. 58-58

ELABORATI

1. **Majstorović, D.**, Štifanić, M., Diković, M. (2021). Elaborat akreditiranog studijskog programa, diplomski sveučilišni studij Sestrinstvo.
2. **Majstorović, D.**, Antić, G. (2023) Program cjeloživotnog obrazovanja "Specijalističko usavršavanje prvostupnika sestrinstva u djelatnosti hitne medicine"

MENTORSTVO – ZAVRŠNI RAD

- Metodički pristup nastavi procesa zdravstvene njege – Utvrđivanje potreba za zdravstvenom njegom
- Metodički pristupi nastavi procesa zdravstvene njege – Planiranje zdravstvene njege
- Intervencije za sprečavanje padova u domovima za starije osobe
- Didaktički materijali u obrazovanju starijih osoba
- Mnemothnike u nastavi zdravstvene njege

PROFESIONALNI INTERESI I ČLANSTVA – Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Medicinski fakultet

članica:

- 2023. – odbora za nastavu i studente
- 2023. – zamjenski član Povjerenstva za procjenu etičnosti istraživanja
- 2023. – radne skupine Ministarstva zdravstva za pripremu dokumentacije za provedbu specijalističkog usavršavanja prvostupnika sestrinstva u djelatnosti hitne medicine
- 2022. – radne skupine za izradu Plana rodne ravnopravnosti
- 2022. – izvršna urednica Web MFPU
- 2022. – komunikacijskog tima za upisnu promociju
- 2020. – konferencije fakulteta zdravstvenih studija RH
- 2020. – Povjerenstva za akademsko priznavanje inozemnih visokoškolskih kvalifikacija i razdoblja studija
- 2019. – ECTS koordinator studij Sestrinstvo
- 2003. – Hrvatske komore medicinskih sestara

NAGRADE I PRIZNANJA

- stipendija doktorandima Sveučilišta u Rijeci
- stipendija Istarske županije
- Dekanova nagrada za postignuti uspjeh, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- stipendija Rockwool Adriatic grupe
- 2018., 2019., 2020., 2021., 2022., 2024. nagrada Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli za postignute izvrsne rezultate i ostvaren značajan institucijski doprinos