

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Vičić

**Primjena mikronukleus metode i
fluorescencijske hibridizacije u
procjeni stupnja kromosomske
nestabilnosti i nastajanja slobodnoga
oblika Downovoga sindroma u
roditelja mlađe životne dobi**

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Vičić

**Primjena mikronukleus metode i
fluorescencijske hibridizacije u
procjeni stupnja kromosomske
nestabilnosti i nastajanja slobodnoga
oblika Downovoga sindroma u
roditelja mlađe životne dobi**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu – Klinička bolnica “Sveti Duh”, Zagreb

Voditelj rada: izv.prof.dr.sc. Feodora Stipoljev

Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Feodori Stipoljev na potpori, strpljenju te nesebičnoj pomoći koju mi je pružila pri izradi i pisanju ovog rada.

Hvala na stručnim savjetima i prenesenom znanju.

Zahvaljujem svim zaposlenicima Odjela za laboratorijsku citogenetiku na pomoći pri izradi praktičnog dijela rada, a posebna zahvala Romani Markulin.

Hvala mojoj obitelji

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Pojavnost i fenotipska obilježja Downova sindroma	3
1.2. Dijagnostika Downova sindroma	5
1.3. Genetska osnova Downova sindroma.....	8
1.4. Etiologija trisomije 21	11
1.4.1. Dob majke kao čimbenik rizika nastajanja trisomije 21	11
1.4.2. Čimbenici rizika za nastanak trisomije 21 u mladih majki	12
1.4.3. Čimbenici rizika očeva podrijetla	16
1.5. Kromosomska nestabilnost u roditelja djece s Downovim sindromom	18
1.6. Mikronukleus metoda.....	20
1.6.1. Mehanizmi nastanka mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova	22
1.6.2. Genetska predispozicija, utjecaj okolišnih čimbenika i životnih navika na učestalost mikronukleusa.....	24
1.6.3. Indeks diobe jezgara (NDI)	27
1.7. Test izazova mitomicinom.....	28
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	29
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
4. ODABIR ISPITANIKA I METODE ISTRAŽIVANJA	31
4.1. Odabir ispitanika.....	31
4.2. Metode	33
4.2.1. Mikronukleus-test.....	33
4.2.2. Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija (FISH).....	36
4.2.3. Test izazova mitomicinom	39
4.2.4. Anketni upitnik.....	40
4.3. Statistička raščlamba	41
5. REZULTATI	43
5.1. Rezultati mikronukleus-testa	47
5.2. Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	52
5.3. Test izazova mitomicinom.....	56

5.4.	Korelacija među ispitivanim biomarkerima	61
5.5.	Analiza krivulje osjetljivosti (ROC analiza)	64
5.6.	Usporedba demografskih podataka, medicinske anamneze, životnih navika i izloženosti okolišnim čimbenicima između ispitivane i usporedne skupine	66
5.6.1.	Sociodemografski podatci	66
5.6.2.	Medicinska anamneza	66
5.6.3.	Životne navike i prehrana.....	67
5.6.4.	Izloženost okolišnim čimbenicima.....	68
5.7.	Analiza povezanosti biomarkera određenih mikronukleus-testom i demografskih čimbenika, osobitosti medicinske i osobne anamneze, životnih navika te izloženosti okolišnim čimbenicima.....	70
5.7.1.	Analiza povezanosti učestalosti mikronukleusa i parametara dobivenih anketnim upitnikom.....	72
5.7.2.	Analiza povezanosti učestalosti mikronukleusa u mononuklearnim stanicama i parametara dobivenih anketnim upitnikom	75
5.7.3.	Analiza povezanosti učestalosti nukleoplazmatskih mostova i parametara dobivenih anketnim upitnikom	78
5.7.4.	Analiza povezanosti učestalosti nuklearnih pupova i parametara dobivenih anketnim upitnikom.....	80
5.7.5.	Analiza povezanosti indeksa diobe jezgara i parametara dobivenih anketnim upitnikom.....	82
6.	RASPRAVA	84
7.	ZAKLJUČCI	93
8.	SAŽETAK	95
9.	SUMMARY	96
10.	LITERATURA	97
11.	ŽIVOTOPIS	116
12.	PRILOZI	117

POPIS OZNAKA I KRATICA

ALL – akutna limfoblastična leukemija

AML – akutna mijeloblastična leukemija

APP – engl. *amyloid precursor protein*, prekursor amiloidnog proteina

CB – engl. *binucleated cell*, binuklearna stanica

CBMN – engl. *cytokinesis-block micronucleus assay*, mikronukleus metoda sa zaustavljenom citokinezom

CT – engl. *computed tomography*, kompjuterizirana tomografija

CVS – engl. *chorionic villus sampling*, biopsija korionskih resica

DAT – engl. *dementia of Alzheimer type*, demencija Alzheimerova tipa

DCR-1 – engl. *Down minimum critical region 1*, minimalna kritična regija-1

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

DS – engl. *Down syndrome*, Downov sindrom

DSCR – engl. *Down syndrome critical region*, Down sindrom kritična regija

FISH – engl. *fluorescence in situ hybridization*, fluorescencijska *in situ* hibridizacija

GSTM1 – engl. *glutathione S-transferase Mu 1*, glutation S-transferaza Mu 1

GSTT1 – engl. *glutathione S-transferase Theta 1*, glutation S-transferaza theta 1

HR – engl. *homologous recombination*, homologna rekombinacija

HUMN – engl. *The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Population*

IL-2 – interleukin 2

lncRNA – engl. *long noncoding RNA*, dugačke nekodirajuće RNA

MC – engl. *mononucleated cell*, mononuklearna stanica

MHFTR – engl. *5,10-methylenetetrahydrofolate*, 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza reductase

MMC – engl. *mitomycin C*, mitomicin C

miRNA – engl. *microRNA*, mikro RNA

MN – engl. *micronucleus*, mikronukleus

MX1 – engl. *MX Dynamin Like GTPase 1*, MX dinaminu slična GTP-aza 1

NBUD – engl. *nuclear bud*, nuklearni pup

NDI – engl. *nuclear division index*, indeks diobe jezgara

NHEJ – engl. *non-homologous end joining*, nehomologno spajanje krajeva

NPB – engl. *nucleoplasmic bridge*, nukleoplazmatski most

RCAN1 – engl. *regulator of calcineurine*, regulator kalcineurina

SAC – engl. *spindle assembly checkpoint*, kontrolna točka diobenog vretena

SAM – engl. *S-adenosylmethionine*, S-adenozilmetionin

SNP – engl. *single nucleotide polymorphisms*, polimorfizam pojedinačnog nukleotida

THD – engl. *tetrahydrofolate*, tetrahidrofolat

1. UVOD

Downov sindrom (DS) je najčešći kromosomski poremećaj i najčešći uzrok duševne zaostalosti u humanoj populaciji (1-3). Pored slobodnog ili regularnog oblika (trisomija 21) koji se javlja u gotovo 95% osoba, s obzirom na vrstu kromosomskog poremećaja razlikujemo još dva tipa DS-a: translokacijski oblik kod kojeg je treći kromosom 21 vezan na drugi akrocentrični kromosom tvoreći Robertsonovu translokaciju, te mozaični oblik kod kojeg su prisutne dvije stanične linije, jedna normalnog kariotipa i druga aneuploidna za trisomiju 21 (4). Iako je Lejeune davne 1959. godine otkrio kako je DS posljedica prisutnosti tri kopije kromosoma 21, još uvijek se malo zna o mehanizmima nerazdvajanja koji dovode do nastanka slobodnog oblika DS-a (5). I danas procesi uključeni u nastajanje zametka sa slobodnim oblikom DS-a predstavljaju biološku enigmu. Kod 90-95% osoba s DS-om trisomija nastaje kao posljedica abnormalne rekombinacije i nerazdvajanja kromosoma 21 u prvoj ili drugoj mejotičkoj diobi majke, dok je u oko 4-10% slučajeva uzrok nerazdvajanje kromosoma tijekom očeve spermatogeneze (6,7). Do sada jedini dokazani čimbenik rizika kromosomskog nerazdvajanja jest starija dob majke u trenutku začeća (8). Postoje brojne hipoteze kojima se pokušao objasniti utjecaj majčine dobi na nastanak trisomije 21. Prema većini, glavni negativni učinak ima poremećena funkcija diobenog aparata u majčinim jajnim stanicama uzrokovana starenjem i višegodišnjoj izloženosti vanjskim štetnim utjecajima (9,10). Međutim, više od 40% trudnoća s DS-om upravo se otkrije kod žena mlađih od 35 godina (2). Malo je literaturnih podataka o uzrocima povećane sklonosti pogrešnom razdvajanju kromosoma kod mladih parova koji u svojoj anamnezi imaju trudnoću s trisomijom 21. No pretpostavlja se da bi na nerazdvajanje kromosoma mogli utjecati različiti genetički i epigenetički čimbenici, ali i životne navike i prehrana roditelja (11). Nedavnim istraživanjima citogenetičkih osobitosti perifernih krvi parova koji su u mlađoj dobi imali trudnoću ili dijete s DS-om uočava se veća učestalost pogrešnog razdvajanja kromosoma 21 u limfocitima majki, ali i očeva takve djece. Istraživanja su također pokazala kako je kod parova koji su imali dvije trudnoće s trisomijom 21 učestalost nerazdvajanja kromosoma u stanicama perifernih krvi bila značajno viša nego kod onih sa samo jednom takvom trudnoćom (12-14). Analizom velikog broja limfocita pomoću fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), u mladih parova koji u svojoj anamnezi imaju jednu ili više trudnoća s DS-om uočava se veća učestalost stanica s trisomijom 21. Stoga se pretpostavlja da bi i u fenotipski normalnih roditelja djece s DS-om mogao biti prisutan kriptički mozaicizam za

trisomiju 21 (15-17). U prilog ovoj pretpostavci ide i istraživanje Kovaleve (18) koja veći postotak trisomičnih stanica uočava i među spolnim stanicama. U konačnici, autori postavljaju hipotezu da ti parovi imaju veću sklonost nepravilnoj raspodjeli kromosoma i to ne samo kod mitotskog dijeljenja somatskih stanica, već i tijekom gametogeneze. Kao idealna, odnosno kompleksna, a pri tome brza i automatizirana metoda za proučavanje kromosomske nestabilnosti pokazao se mikronukleus-test (MN-test) na limfocitima periferne krvi (19). Stoga smo u ovom istraživanju odlučili ispitati sklonost pogrešnom razdvajanju kromosoma tijekom mitotske diobe u limfocitima perifernih krvi mladih parova koji u svojoj anamnezi imaju trudnoću ili dijete sa slobodnim oblikom DS-a, mjerenjem stupnja genomske nestabilnosti mikronukleus metodom i metodom fluorescencijske *in situ* hibridizacije.

1.1. Pojavnost i fenotipska obilježja Downova sindroma

Pojavnost DS-a procjenjuje se između 1 na 700 do 1 na 1000 živorođene djece, a ako se tome pribroje i trudnoće koje završe medicinski indiciranim pobačajem ili mrtvorodjenom djecom, tada pojavnost iznosi 1 na 450 poroda. U posljednjih 30 godina u Europi se uočava porast broja trudnoća s DS-om za 10%, a kao glavni uzrok smatra se trend ostvarivanja majčinstva u kasnijoj životnoj dobi. Ipak, pojavnost živorođene djece nije se mijenjala tijekom posljednjih godina uslijed razvoja veoma rane prenatalne dijagnostike, a time i sve većeg broja prenatalno otkrivenih slučajeva. Značajne razlike u pojavnosti DS-a uočavaju se i među pojedinim zemljama, ovisno o sociokulturološkim aspektima, primjeni različitih postupnika probira trudnica visokog rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda te pravnoj regulaciji pobačaja. Tako se u državama gdje prekid trudnoće zbog medicinskih razloga nije zakonski dozvoljen, kao što su Poljska ili Malta, uočava trostruko veći broj živorođene djece s DS-om (2,20,21). U razdoblju od 2009. do 2012. godine u Republici Hrvatskoj je zabilježena pojavnost DS-a od 6,49 na 10000 živorođenih (22).

Kliničku sliku DS-a prvi je 1866. godine opisao John Langdon Haydon Down, po kome je sindrom i dobio ime (23). Iako kliničke osobitosti variraju među osobama s DS-om, najčešća fenotipska obilježja uključuju duševnu zaostalost, hipotoniju i hiperfleksibilnost zglobova, kratke šake sa specifičnom poprečnom brazdom, izražen razmak između 1. i 2. nožnog prsta, karakterističan izgled glave i lica s kosim očnim rasporcima, epikantusom, udubljenim korijenom nosa, malenim ustima uz protruziju jezika te nepravilno razvijenim, nisko položenim ušima. Prirođena srčana greška nalazi se u više od 40% osoba, a mogu biti prisutne i malformacije probavnog, mokraćno-spolnog i dišnog sustava (24). Oko 60-70% osoba s DS-om ima oštećenje sluha (25,26), dok je oštećenje vida prisutno u oko 38% djece mlađe od godinu dana (27) te kod više od 80% odraslih osoba (28). Kožne promjene javljaju se u oko 90% djece (29), a nerijetko su prisutni i poremećaji funkcije štitne žlijezde (30). Djeca s DS-om imaju 10 do 20 puta veći rizik oboljenja od akutne mijeloblastične leukemije (AML) i akutne limfoblastične leukemije (ALL) (31), dok je incidencija solidnih tumora u osoba s DS-om znatno manja u odnosu na opću populaciju (32). Više od polovine osoba starijih od 45 godina boluje od demencije Alzheimerova tipa (DAT) (33).

Iako pubertet u adolescenata oba spola nastupa u otprilike isto vrijeme kao i u zdravih vršnjaka (24), neplodnost je prisutna u gotovo svih muškaraca s DS-om, uz iznimku pojedinačnih slučajeva roditeljstva objavljenih u literaturi. Nasuprot tome, smatra se da je

veliki broj žena s nemozaičnim oblikom trisomije 21 plodan, međutim rizik rađanja ploda s DS-om je izrazito visok i iznosi između 35 i 50% (34). Posljednjih desetljeća duljina života osoba s DS-om u konstantnom je porastu te danas prosječan životni vijek u razvijenim zemljama iznosi oko 60 godina (35), u usporedbi s prosječnom smrtnošću u 22-goj godini života sedamdesetih godina prošlog stoljeća (36).

Molekularni mehanizmi koji dovode do varijabilnosti kliničkih osobitosti među osobama s DS-om još uvijek nisu sasvim razjašnjeni. Smatra se kako su geni odgovorni za većinu fenotipskih obilježja DS-a smješteni unutar kromosomske regije 21q22.1-22.3. Stoga se ta regija koja sadrži otprilike 40 gena naziva „Down sindrom kritičnom regijom“ (engl. Down syndrome critical region, DSCR) (37,38). Tri kopije kromosoma 21 rezultiraju povišenim izražajem određenih gena u različitim tkivima i razvojnim stadijima, odnosno 1,5 puta većom dozom genskog produkta u odnosu na euploidne stanice. Proučavanjem transkriptoma stanica s trisomijom 21 uočava se povišena razina izražajnosti većine gena smještenih na kromosomu 21, ali i promijenjena razina izražajnosti gena dugih kromosoma. Dakle, osim primarnog učinka, povećana aktivnost gena kromosoma 21 utječe i na izražaj i funkcioniranje drugih gena unutar genoma (39). Stoga se smatra da bi povećana učestalost ALL-a i AML-a, Hirschsprungove bolesti te bolesti štitnjače, ali i smanjen rizik za pojavu ateroskleroze i solidnih tumora u osoba s DS-om mogla biti posljedicom utjecaja trisomije 21 na izražajnost gena odgovornih za razvoj navedenih poremećaja (40,41). Nadalje, smatra se da bi na različitosti kliničkih osobitosti DS-a mogle utjecati i varijacije u broju kopija (engl. copy number variation, CNV), polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) te *de novo* mutacije gena smještenih na različitim kromosomima (42). Također, obrasci metilacije deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid, DNA) i epigenetičke promjene mogu različito djelovati na izražajnost gena te molekularne puteve u stanici (43).

1.2. Dijagnostika Downova sindroma

Konačna dijagnoza DS-a postavlja se citogenetskom analizom koja je prenatalno indicirana u trudnica s visokim rizikom rađanja kromosomski bolesnog ploda ili postnatalno u osoba kod kojih se uoče kliničke osobitosti DS-a. S obzirom da fenotipska obilježja osoba s DS-om mogu značajno varirati, posebice u onih s mozaičnim oblikom, prema istraživanju Devlina i Morrisona (44) kliničkim pregledom prepoznata se 90 do 100% osoba s regularnim ili translokacijskim tipom, te tek nešto više od trećine osoba s mozaičnim oblikom DS-a. U većini slučajeva mozaični oblik DS-a ne dijagnosticira se uslijed izostanka fenotipskih obilježja ili uslijed nemogućnosti detekcije kriptičkog mozaicizma. Također, u obzir treba uzeti i činjenicu da starenjem u osoba s DS-om opada udio stanica s trisomijom 21. Tako Jenkins i suradnici (45) u 15,2% osoba sa slobodnim oblikom DS-a starijih od 45 godina uočavaju pojavnost stanica s disomijom 21 u rasponu od 2-30%. Nadalje, proučavanjem nerazdvajanja kromosoma 21 u binuklearnim limfocitima, Shi i suradnici (46) nalaze znatno veći udio disomičnih stanica te veću razinu nerazdvajanja kromosoma 21 u djece s DS-om, u odnosu na učestalost nerazdvajanja i udio monosomičnih stanica u zdravih kontrola. Ova istraživanja idu u prilog pretpostavci o negativnoj selekciji, odnosno opadanju udjela aneuploidnih stanica u uvjetima *in vivo*. Stoga se kao metoda izbora pri analizi mozaicizama, posebice onih s niskim udjelom trisomičnih stanica, preporuča fluorescencijska *in situ* hibridizacija koja omogućava specifičnu analizu velikog broja stanica. Kako bi se izbjegao učinak dugotrajne kultivacije, metoda izbora je analiza nativnih uzoraka stanica. U konačnici, prilikom dijagnostike DS-a ne smije se zanemariti mogućnost prisustva kriptičke translokacije koja uključuje DSCR, a koja se klasičnom citogenetskom analizom ne može utvrditi.

Prenatalna dijagnostika Downova sindroma obuhvaća procjenu rizika rađanja djeteta s kromosopatijom primjenom neinvazivnih metoda probira, dok se konačna dijagnoza postavlja na temelju analize fetalnih stanica dobivenih jednom od invazivnih metoda, biopsijom korionskih resica (engl. chorionic villus sampling, CVS) ili ranom amniocentezom (RACZ) (47). Neinvazivne metode probira temelje se na podacima o majčinoj dobi, mjerenju razine serumskih biokemijskih biljega, prisustvu ultrazvučnih biljega u prvom ili drugom tromjesečju trudnoće ili analizi fetalne slobodne DNA. Tijekom proteklih godina primjenjivani su različiti postupnici probira visokorizičnih trudnoća, dok se danas procjena rizika rađanja kromosomski bolesnog djeteta zasniva na individualnom izračunu rizika za svaku trudnicu ponaosob (48,49). Pojavnost trisomije 21 ovisna je o dobi trudnice, te iznad 30. godine eksponencijalno raste. Uslijed činjenice da se 30-40% plodova s DS-om spontano

pobaci tijekom drugog i trećeg tromjesečja (50,51), rizik rađanja djeteta s trisomijom 21 opada s trajanjem trudnoće (tablica 1).

Tablica 1. Procjena pojavnosti trisomije 21 u ovisnosti o dobi majke i trajanju trudnoće.

Dob majke (godine)	Gestacijska dob (tjedni trudnoće)		
	12	16	40
Rizik (1/n)			
	n	n	n
20	898	1053	1527
25	795	933	1352
30	526	617	895
31	457	536	776
32	338	455	659
33	322	378	547
34	262	307	446
35	210	246	356
36	165	193	280
37	128	150	218
38	98	115	167
39	75	88	128
40	57	67	97
41	43	50	73
42	32	38	55

Izvor: prilagođeno prema podacima autora Nicolaidis KH (52).

Procjena rizika ponavljanja trisomije 21 u idućim trudnoćama tradicionalno se temeljila na nekoliko modela. Prema jednome rizik ponavljanja u svih trudnica dvostruko je veći u odnosu na rizik dobi, dok se prema drugom modelu rizik pojavnosti trisomije 21 u idućim trudnoćama procjenjuje na 1% (53,54). Suprotno tome Stene (55) ne uočava povećan rizik ponavljanja trisomije 21 u trudnica starijih od 30 godina, dok u mlađih majki procjenjuje pojavnost DS-a od 1%. Novija istraživanja ipak upućuju na povećan rizik pojavnosti kromosomski abnormalnog ploda u svih žena koje u anamnezi imaju trudnoću s trisomijom 21, pri čemu se značajno veći rizik uočava kod mlađih trudnica (56,57) (tablica 2). Tako primjerice u 12. tjednu trudnoće u majke od 35 godina rizik pojavnosti trisomije 21 u idućoj trudnoći raste od 1/210 (0,476%) do 1/131 (0,763%), a u 25-godišnje trudnice od 1/795

(0.126%) do 1/97 (1,031%). Uzroci povećanog rizika ponavljanja aneuploidija u mlađih trudnica nisu sasvim razjašnjeni. Iako bi se ponavljanje iste trisomije kod dijela trudnica moglo objasniti postojanjem mozaicizma spolnih stanica (58,59), viši rizik za pojavu različitih numeričkih aberacija upućuje na postojanje drugih čimbenika kao što su genetska predispozicija nepravilnom razdvajanju kromosoma ili izloženost okolišnim utjecajima (56,60,61).

Tablica 2. Procjena rizika pojavnosti aneuploidija u trudnica s prethodnom trudnoćom sa slobodnim oblikom DS-a; izražena u obliku višekratnika rizika pojavnosti trisomije 21 za dob majke.

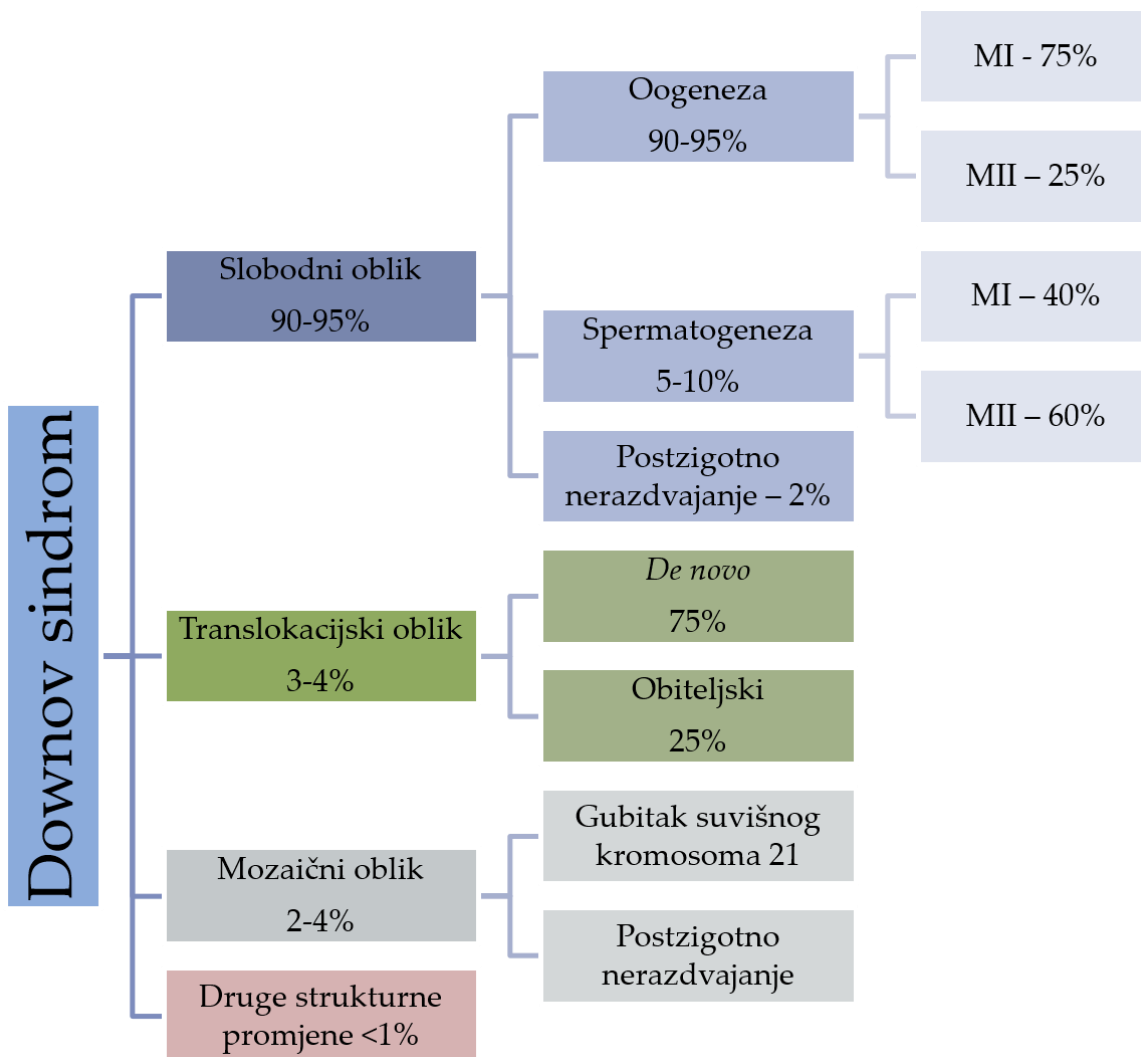
Dob majke u vrijeme prenatalne dijagnostike	Porast pojavnosti u odnosu na rizik dobi*	
	Trisomija 21	Druge vijabilne aneuploidije (trisomija 13 i 18, XXX, XXY)
Trudnoća s trisomijom 21 u dobi < 30 godina		
< 30 godina	8,2 x	2,5 x
≥ 30 godina	2,2 x	2,3 x
Ukupno	4,7 x	2,4 x
Trudnoća s trisomijom 21 u dobi ≥ 30 godina		
≥ 30 godina	1,6 x	1,7 x
Ukupan rizik ponavljanja neovisno o dobi trudnice		
	2,4 x	2,0 x

*U tablici su navedeni višekratnici kojima se pri izračunu rizika množi vrijednost pojavnosti trisomije 21 procijenjene za dob trudnice u određenom tjednu trudnoće (tablica 1).

Izvor: prilagođeno prema podacima Warburton i suradnika (56).

1.3. Genetska osnova Downova sindroma

Najčešći uzrok DS-a jest trisomija 21, dok rjeđe nalazimo i druge, podrijetlom i etiologijom različite citogenetske promjene kromosoma 21 (slika 1). Slobodni ili regularni oblik (trisomija 21) javlja se u više od 90% osoba s DS-om, a najčešće nastaje kao posljedica abnormalne rekombinacije i nerazdvajanja kromosoma 21 tijekom prve ili druge mejotičke diobe u nezrelim spolnim stanicama. U 90-95% slučajeva nepravilno razdvajanje odvija se tijekom majčine oogeneze, tri puta češće u prvoj mejotičkoj diobi nego u drugoj. Nerazdvajanje kromosoma za vrijeme spermatogeneze uzrokom je trisomije 21 u 5-10% slučajeva, a u više od polovice slučajeva događa se u drugoj mejotičkoj diobi. Tek u nešto manje od 2% osoba sa slobodnim oblikom DS-a trisomija 21 nastaje uslijed postzigotnog mitotskog nerazdvajanja kromosoma (6,62,63). Nadalje, oko 3-4% osoba s DS-om ima translokacijski oblik kod kojeg je treći kromosom 21 vezan na drugi akrocentrik tvoreći Robertsonovu translokaciju. Translokacija se može naslijediti od roditelja ili nastati *de novo*. U 2-4% osoba radi se o mozaičnom obliku, pri čemu postoje dvije stanične linije, jedna normalnog kariotipa i druga aneuploidna za trisomiju 21. Iznimno rijetko, tj. u manje od 1% osoba s DS-om nalazi se parcijalna trisomija 21. kromosoma koja nastaje kao posljedica nebalansirane recipročne translokacije između kromosoma 21 i nekog drugog kromosoma, ili duplikacije dijela 21. kromosoma koji sadrži DSCR (4).



Slika 1. Shematski prikaz učestalosti i podrijetla kromosomskih promjena u osoba s DS-om. MI – prva mejotička dioba, MII – druga mejotička dioba.

Sekvenciranje kromosoma 21 (engl. human chromosome 21, HSA21) završeno je 2000. godine, no unatoč brojnim istraživanjima i golemom napretku, još uvijek nije sasvim razjašnjena raspodjela i uloga kodirajućih i nekodirajućih sljedova (64). Smatra se da otprilike 3,6% sekvence kromosoma 21 čini egzonska DNA – sljedovi koji kodiraju proteine, pseudogeni, mikro RNA (engl. microRNA, miRNA), dugačke nekodirajuće RNA (engl. long noncoding RNA, lncRNA); 12,4% regulatorni sljedovi (promotorske regije, pojačivači, omeđivači); 36% ponavljajući sljedovi (raspršena ponavljanja, ponavljanja u nizu), dok za 48% sekvence nije utvrđena uloga. Do danas je opisano 240 gena koji kodiraju proteine, a

smatra se da je mali broj gena, ali i sveukupno funkcionalnih sljedova DNA jedan od uzroka zašto je trisomija 21 vijabilna (41). Još uvijek nije poznato koji su sve geni uključeni u patogenezu DS-a. No, pokazalo se da je područje dužine oko 5 Mb između lokusa D21S58 i D21S42 povezano s duševnim zaostajanjem i većinom dizmorfičnih osobina koje se nalaze u osoba s DS-om (37,38). Navedeno područje obuhvaća „minimalnu kritičnu regiju-1“ (Down minimum critical region 1, DCR-1 (21q22.2) i regiju DCR-2 (21q22.3). Nadalje, u području 21q22.12 opisan je regulator kalcineurina (engl. regulator of calcineurine, *RCANI*) koji autori nazivaju *DSCR1*, a povezuje se s duševnom zaostalošću i srčanom greškom (65). Ipak, Eggermann i suradnici (66) navode kako povišena izražajnost *RCANI* nije dostatna za pojavu fenotipskih obilježja DS-a. *DSCR4* i *DSCR8*, smješteni u regiji 21q22.13, izražavaju se u tkivu posteljice i stanicama teratoma testisa te njihova uloga nije sasvim razjašnjena (67). Između lokusa D21S55 i gena za MX dinaminu sličnu GTP-azu 1 (engl. MX Dynamin Like GTPase 1, *MXI*) nalazi se *PSMGI* (engl. proteasome assembly chaperone 1), prije nazivan *DSCR2*. Pretpostavlja se da bi poremećena aktivnost gena za kolagen *COL6A1* i *COL6A2* (engl. collagen type VI alpha 1 and 2 chain) mogla uzrokovati pojavu atrioventrikularnog septalnog defekta (AVSD), gena za superoksid-dismutazu 1 (engl. superoxide dismutase 1, *SOD1*) prijevremeno starenje, dok se povišena izražajnost *CHAF1B* (engl. chromatin assembly factor 1 subunit B) povezuje s poremećenom sintezom DNA (37). Dakle područje između *RCANI* i *MXI* sadrži otprilike 40 gena koji kodiraju proteine, te još 85 gena uključujući pseudogene i gene odgovorne za sintezu miRNA, lncRNA, male jezgrine RNA (engl. small nuclear RNA, snRNA), male nukleolarne RNA (small nucleolar RNA, snoRNA). Ipak, novija istraživanja povezanosti genske osnove i fenotipskih obilježja upućuju i na utjecaj gena smještenih izvan DSCR, ali i djelovanje različitih molekularnih mehanizama (68).

1.4. Etiologija trisomije 21

Starija dob majke jedini je dokazani čimbenik rizika za pojavu DS-a. Međutim, utjecaj majčine dobi na stanične i molekularne mehanizme koji dovode do nastanka trisomije 21 još uvijek nije sasvim razjašnjen (10,13). Činjenica da se tek nešto više od polovice trudnoća s DS-om otkrije kod žena starijih od 35 godina upućuje na postojanje drugih čimbenika rizika osim dobi majke (2). Također, nisu sasvim poznati niti mehanizmi koji dovode do pojave trisomije 21 očevog podrijetla. Danas najzastupljenija hipoteza je da nepravilno razdvajanje kromosoma kod majki i kod očeva uzrokuju dva odvojena događaja. Prvi je snižena razina, izostanak ili nepravilan proces rekombinacije u profazi prve mejotičke diobe. Drugi događaj je nesposobnost spolne stanice da prepozna i odgovori na takvu promijenjenu rekombinaciju, što dovodi do nepravilne raspodjele kromosoma tijekom anafaze prve ili druge mejotičke diobe i konačno do nastanka kromosomski abnormalnih spolnih stanica (7,69). Nadalje, pretpostavlja se da bi na pojavu trisomije 21 utjecaj mogla imati genetska predispozicija, primjerice polimorfizmi gena uključenih u metabolizam folata (70), epigenetički procesi u vidu promijenjenih obrazaca globalne metilacije DNA (71), ali i životne navike i prehrana roditelja (8).

1.4.1. Dob majke kao čimbenik rizika nastajanja trisomije 21

Poznato je da rizik rađanja djeteta s trisomijom 21 raste sa životnom dobi majke te u 25-godišnje trudnice iznosi 1/1350, dok u majki od 35 i 45 godina iznosi 1/350 i 1/23 (72). Postoje brojne hipoteze kojima se pokušao objasniti utjecaj majčine dobi na nastanak trisomije 21, a razlikuju se s obzirom na uzroke te stadij oogeneze u kojem dolazi do pogrešnog razdvajanja kromosoma. Naime, tijekom sazrijevanja ženskih spolnih stanica primarna oocita ulazi u prvu mejotičku diobu između 10. i 13. tjedna fetalnog razvoja kada se odvija sparivanje homolognih kromosoma i proces rekombinacije. Do kraja trudnoće oocita doseže stadij diplotena profaze I u kojem ostaje sve do puberteta. Druga mejotička dioba odvija se neposredno prije ovulacije, a završava tek u slučaju oplodnje (73). Pregledom literature Rowsey i suradnici (10) svrstavaju hipoteze vezane uz pogreške nastale tijekom mejotske diobe stanica u četiri skupine. Prema prvoj teoriji nerazdvajanje kromosoma uzrokuje snižena razina rekombinacije u profazi prve mejotičke diobe, dok se utjecaj majčine dobi objašnjava pretpostavkom da oocite s manjim brojem hijazmi kasnije ulaze u drugu

mejotičku diobu, odnosno ovulaciju. Druga hipoteza je da do nerazdvajanja kromosoma dolazi uslijed oštećenja same molekule DNA ili proteina diobenog aparata (kohezina, sinaptonemskog kompleksa, mikrotubula) uzrokovanih višegodišnjoj izloženost vanjskim utjecajima. Na temelju istraživanja provedenih na mišjim modelima nekoliko skupina autora predlaže kako bi jednu od najvažnijih uloga u nerazdvajanju kromosoma povezanog sa starenjem mogla imati snižena razina kohezinskih proteina kao što su REC8 (engl. REC8 meiotic recombination protein) i SGO2 (engl. shugoshin 2) (74,75). Treća skupina autora predlaže da bi na funkcioniranje diobenog aparata mogle utjecati fiziološke promjene uzrokovane starenjem kao što je smanjena sposobnost stanica za popravak pogreške ili promjene u razini hormona i funkcioniranju reproduktivnog sustava žene. Dakle prema ovoj teoriji uzrok nerazdvajanju kromosoma bilo bi biološko starenje jajnika, odnosno reproduktivnog sustava. Pretpostavlja se da bi jedan od glavnih uzroka nerazdvajanju kromosoma mogla biti promjena u funkciji kontrolne točke diobenog vretena (engl. spindle assembly checkpoint, SAC) – sustava koji je odgovoran za ulazak stanice u anafazu mitoze i mejoze nakon pravilnog vezanja kromosoma na niti diobenog vretena. Tako se u jajnicima starijih žena uočava smanjena razina izražajnosti *MAD2L1* (engl. mitotic arrest deficient 2 like 1) i *BUB1* (engl. BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase), gena uključenih u SAC (76,77). Konačno, prema četvrtom modelu aneuploidne stanice nastaju kao posljedica dva događaja: nepravilne rekombinacije za vrijeme fetalnog razvoja koju slijedi druga pogreška nastala kasnije u zrelih jajnicima.

Suprotno tome, Hultén i suradnici (78) iznijeli su teoriju prema kojoj su u jajnicima svih žena pored normalnih prisutne i stanice s trisomijom 21 već u fetalnom razdoblju, no većina trisomičnih stanica biva selektivno eliminirana tijekom daljnjeg fetalnog i postnatalnog razvoja. Učinak majčine dobi objašnjava se nakupljanjem trisomičnih stanica koje su uspjele izbjeći apoptozu i doći do stadija ovulacije. Kod mlađih trudnica koje su začele plod s trisomijom 21 iznose pretpostavku da je udio trisomnih stanica u jajnicima, a time i onih koje su izbjegle apoptozu znatno veći.

1.4.2. Čimbenici rizika za nastanak trisomije 21 u mladih majki

Većina istraživanja usmjerenih ka određivanju etiologije trisomije 21 provodi se na populaciji majki neovisno o životnoj dobi. Stoga se iznimno malo zna o uzrocima nastanka trisomije 21 u žena mlađih od 35 godina. I dok se utjecaj starije dobi objašnjava fiziološkim

starenjem i višegodišnjoj izloženosti vanjskim čimbenicima (10), pretpostavlja se da bi kod mlađih žena mogla postojati genetska predispozicija za nepravilno razdvajanje kromosoma. Kao i u starijih majki uočavaju se odstupanja u procesu rekombinacije (79), dok se isključiti ne može niti utjecaj okolišnih čimbenika (60,61,80). Jedna od teorija je i da bi mlade majke djece s DS-om mogle biti biološki starije u odnosu na njihovu životnu dob. Takvo biološko starenje uzrokuje „starenje jajnika“ odnosno promjene u jajnicima vezane uz promijenjenu razinu hormona, količinu oocita i funkcioniranje diobenog vretena, što u konačnici dovodi do većeg broja pogriješaka tijekom mejotske diobe stanica, odnosno povišenog rizika za nerazdvajanje kromosoma (81). U prilog ovoj teoriji idu i rezultati istraživanja Klinea i suradnika (82) koji su uočili kako žene s poviješću spontanih pobačaja aneuploidinih plodova otprilike godinu dana ranije ulaze u menopauzu, u odnosu na kontrolnu skupinu žena s kromosomski normalnim pobačajem i majke zdrave djece. Van Montfrans i suradnici (83) u majki djece s DS-om također uočavaju veću učestalost povišene razine folikul-stimulirajućeg hormona (FSH). Prema drugoj teoriji majke koje u svojoj anamnezi imaju trudnoću s DS-om bi mogle biti „genetički starije“ od žena iste životne dobi. Ova teorija se temelji na ispitivanjima dužine telomera, pri čemu se kod žena koje su u mlađoj dobi imale trudnoću s trisomijom 21 uočava značajno skraćanje telomera (84). Pretpostavlja se da bi genetičko starenje moglo biti jedan od ključnih uzroka svih promjena koje se povezuju sa poremećajima oogeneze, odnosno nepravilnim funkcioniranjem diobenog aparata u majčinim jajnim stanicama koje dovodi do nastanka aneuploidije (85). Ovoj teoriji u prilog ide i spoznaja o važnoj ulozi telomera ne samo kod mitotskog dijeljenja, već i kod mejotičke diobe spolnih stanica (86,87).

1.4.2.1. Rekombinacija

Homologna rekombinacija ili izmjena genetičkog materijala između nesestrinskih kromatida homolognih kromosoma odvija se u profazi prve mejotičke diobe. Na mjestima gdje je došlo do kromatidne izmjene stvaraju se hijazme, odnosno strukture kojima kromosomi ostaju vezani sve do njihovog razdvajanja u anafazi I. Izostanak, povećan broj ili nepravilan položaj kromatidnih izmjena, a posljedično i hijazmi dovodi do nepravilnog razdvajanja kromosoma (88). U otprilike 70% slučajeva trisomije 21 majčinog podrijetla nerazdvajanje kromosoma događa se tijekom prve mejotičke diobe, dok u 30% slučajeva do nerazdvajanja dolazi u drugoj mejotičkoj diobi. Hijazma smještena na sredini dugog kraka

kromosoma 21 omogućuje pravilnu raspodjelu kromosoma tijekom oogeneze. U oko 45% trisomija 21 uočava se potpuni izostanak rekombinacije, dok je u ostalim slučajevima prisutna samo jedna rekombinacija smještena u distalnom ili proksimalnom dijelu dugog kraka kromosoma 21. Pri tome izostanak rekombinacije ili nepravilan položaj u telomernom području dovode do nerazdvajanja kromosoma tijekom prve mejotičke diobe, dok rekombinacija smještena u pericentromernom području uzrokuje nerazdvajanje u drugoj mejotičkoj diobi (79). Uočena je sveza između životne dobi majke i položaja rekombinacije. Tako je u mlađih majki češće prisutno nerazdvajanje kromosoma tijekom prve mejotičke diobe koje nastaje kao posljedica izostanka ili telomernog položaja rekombinacije (89,90). Genetski uzroci izostanka rekombinacije nisu poznati. Tek je istraživanje na mišjim modelima pokazalo da bi jedan od uzroka mogle biti mutacije u genima odgovornim za sintezu proteina sinaptonemskog kompleksa (91). Nadalje, Ghosh i suradnici su uočili statistički značajno povećanje udjela višestrukih hijazmi u slučajevima nerazdvajanja tijekom prve mejotičke diobe u različitim dobnim skupinama. Pri tome je najmanji postotak višestrukih hijazmi uočen u mlađoj grupi, a najveći u najstarijoj skupini majki. Rezultati ovog istraživanja podupiru hipotezu prema kojoj bi broj hijazmi mogao imati „zaštitničku“ ulogu učincima nastalim uslijed starenja (62). Nepravilan proces rekombinacije uočava se i u slučajevima nerazdvajanja kromosoma 21 nastalih tijekom druge mejotičke diobe. Rekombinacija je smještena bliže pericentromernom području kromosoma, a ovaj tip pogreške najčešće je prisutan u starijih majki (92,93). U konačnici, smatra se da bi inicijalni događaj u većini slučajeva trisomije 21 mogla biti pogrešna rekombinacija, uslijed koje dolazi do nerazdvajanja kromosoma u prvoj mejotičkoj diobi, ali posredno i do pogrešnog razdvajanja kromosoma u drugoj mejotičkoj diobi (94).

1.4.2.2. Metabolizam folata

Folati spadaju u skupinu esencijalnih vitamina neophodnih za rast i razvoj organizma, a u hrani ih nalazimo u citrusnom voću, zelenom lisnatom povrću, žitaricama, grahoricama te životinjskim iznutricama (jetra) (95). Biološki aktivni oblik folata je tetrahidrofolat (THD) koji sudjeluje u brojnim reakcijama uključujući metabolizam aminokiselina, sintezu nukleinskih kiselina te brojne metilacijske procese u ljudskom organizmu (96). Poznato je kako nedostatan unos folata utječe na pojavu anemije, gubitka težine, neuroloških i

psihijatrijskih poremećaja te kongenitalnih abnormalnosti kao što su defekti neuralne cijevi (97-99).

James i suradnici (100) su još 1999. godine postavili sumnju na povezanost između SNP-a gena uključenih u metabolički put folata i pojavnosti trisomije 21. Autori su uočili veću učestalost polimorfizma c.677C>T gena 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (engl. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*) u mlađih majki koje su imale trudnoću s DS-om. Naime, enzim *MTHFR* je jedan od ključnih čimbenika u metaboličkom putu homocisteina čijom se remetilacijom sintetizira esencijalna kiselina metionin. Smanjena aktivnost enzima *MTHFR* dovodi do nakupljanja homocisteina u plazmi, smanjene sinteze metionina, a posljedično i do snižene razine davatelja metilne skupine S-adenozilmetionina (engl. S-adenosylmethionine, SAM). Autori postavljaju hipotezu da bi nedostatna količina SAM-a mogla uzrokovati hipometilaciju pericentromernog područja kromosoma, što pak dovodi do promijenjene funkcije kinetohornog aparata te nerazdvajanja kromosoma 21. Međutim, ovoj hipotezi ne ide u prilog pretpostavka da je nepravilna rekombinacija u mladim majki većinom posljedica izostanka ili telomernog položaja rekombinacije (89,90). Ipak, poznato je da globalna metilacija DNA utječe na proces rekombinacije i nestabilnost genoma čime se ne može isključiti povezanost rekombinacije, epigenetičkih promjena i metabolizma folata (101,102). Također je dokazano da u kombinaciji sa smanjenim unosom folata iz prehrane, ovaj polimorfizam dovodi do hipometilacije DNA u leukocitima perifernih krvi mladih žena (103), dok je nedavno istraživanje pokazalo sniženu razinu globalne metilacije DNA u majki djece s DS-om (71).

U posljednjih 20 godina provedene su brojne studije kojima se pokušalo razjasniti postoji li veza između polimorfizama gena uključenih u metabolizam folata ili nedostatnog unosa folata i rizika rađanja djeteta s DS-om. Dobiveni rezultati uglavnom su kontradiktorni, a pretpostavlja se da bi kombinacija polimorfizama dvaju ili više gena mogla imati utjecaj na pojavu DS-a (8,104,105). Također, u malom broju istraživanja skupina mlađih majki izdvojena je iz opće populacije žena s trudnoćom s DS-om. Ipak, Copedde i suradnici (106,107) su proučavanjem polimorfizama gena vezanih uz metabolizam folata, među kojima i *MTHFR*, gena metionin sintaze *MTR* (engl. 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase, *MTR*) te gena 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaza reduktaze (engl. 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase, *MTRR*) uočili povezanost genotipova *MTHFR* 677TT/*MTR* 2756AA i *MTR* 2756AG/*MTRR* 66AG s rizikom rađanja djeteta s DS-om u majki mlađih od 35 godina.

1.4.2.3. Utjecaj životnih navika i okolišnih čimbenika

Dosadašnja istraživanja o utjecaju okolišnih čimbenika i životnih navika na pojavu trisomije 21 su uglavnom kontradiktorna te zasada nisu sasvim razjašnjeni učinci istih. Više autora uočilo je povezanost prekomjerne tjelesne težine majki s rizikom rađanja djeteta s DS-om. Mehanizmi kojima bi tjelesna težina mogla utjecati na nerazdvajanje kromosoma nisu poznati, ali autori pretpostavljaju da bi mogli biti posljedica lošijeg socioekonomskog statusa, načina prehrane ili fizioloških promjena povezanih s debljinom (80,108). Veća učestalost trudnoća s DS-om uočena je u majki koje su neposredno prije ostvarenja trudnoće uzimale hormonsku kontracepcijsku terapiju, no ovaj učinak povezuje se sa starijom dobi majke (60). Nije uočena povezanost konzumacije alkohola i povećanog rizika rađanja kromosomski abnormalnog ploda (109), dok utjecaj izloženosti duhanskim proizvodima još uvijek nije razjašnjen. Ipak, dvije skupine autora zapažaju da bi na pojavu trisomije 21 mogla utjecati majčina izloženost duhanskom dimu ili konzumacija duhana za žvakanje (60,110). Nadalje, uočeno je da izloženost dimu cigarete tijekom embrionalnog razvoja dovodi do promjena globalne metilacije DNA (111). Ova činjenica ide u prilog teoriji prema kojoj bi izloženost različitim okolišnim čimbenicima još za vrijeme embrionalnog razvoja mogla utjecati na proces rekombinacije koji se upravo odvija u fetalnom razdoblju, a što bi u konačnici moglo uzrokovati nastanak aneuploidinih jajnih stanica u odrasloj dobi, odnosno uzrokovati začecje ploda s trisomijom 21. Epidemiološka istraživanja ukazuju i na mogući utjecaj okolišnih čimbenika na pojavu trisomije 21. Dolk i suradnici (112) pretpostavljaju da bi na pojavnost DS-a moglo utjecati atmosfersko onečišćenje, dok druga skupina autora navodi mogući utjecaj onečišćenja vode za piće (113). Smatra se da bi mogla postojati i veza između učestalosti DS-a u Europi i izloženosti niskim dozama zračenja kao posljedice černobilske nuklearne katastrofe (61).

1.4.3. Čimbenici rizika očeva podrijetla

Utjecaj čimbenika očevog podrijetla na nastanak trisomije 21 znatno je rjeđe proučavan u odnosu na veliki broj istraživanja vezanih uz majčino podrijetlo. Iako se smatra kako životna dob oca ne utječe na pojavu trisomije 21, rezultati dosadašnjih istraživanja nisu jednoznačni. Prema većini ne postoji veza između dobi oca i pojave DS-a ili se tek neznatno veći rizik uočava u očeva starijih od 40 godina (7,114). Suprotno tome, Steiner i suradnici (115) uočavaju dvostruko veći rizik rađanja djeteta s DS-om u mladih očeva. Nadalje, kod

trisomije 21 očevog podrijetla u otprilike 30-45% slučajeva do nerazdvajanja kromosoma dolazi tijekom prve mejotičke diobe, dakle znatno manje u usporedbi s tri četvrtine slučajeva kod majki. Ova razlika mogla bi se objasniti činjenicom da sazrijevanje muških spolnih stanica započinje u pubertetu te se odvija bez razdoblja odgode, no utjecaj bi mogli imati i drugačiji mehanizmi koji dovode do nerazdvajanja kromosoma (7). Utjecaj nepravilne rekombinacije u slučajevima trisomije 21 očeva podrijetla još uvijek nije dovoljno istražen. Olivier i suradnici (7) ne uočavaju nepravilan položaj rekombinacije, dok u statistički neznačajno većem broju slučajeva zapažaju izostanak rekombinacije. Ipak, kanadska skupina autora nalazi povećanu učestalost izostanka i nepravilnog položaja rekombinacije na kromosomu 21 u tkivu sjemenika muškaraca s azoospermijom (116).

Saznanja o utjecaju životnih navika i okolišnih čimbenika na pojavu trisomije 21 očevog podrijetla temelje se na proučavanju pojavnosti aneuploidija u sjemenu muškaraca. Iako često istraživani, još uvijek nije sasvim razjašnjen utjecaj konzumacije alkohola, duhanskog dima i kofeina. Nekoliko skupina autora u sjemenu pušača je uočilo povećanu učestalost disomije 13 i aneuploidija spolnih kromosoma, ali ne i disomije 21 (117,118). Nedavnim istraživanjem utjecaja životnih navika na pojavnost aneuploidija uočena je veća učestalost disomije 21 u sjemenu pretilih muškaraca (119). Suprotno, snižena učestalost disomije 21 uočava se kod muškaraca koji su svakodnevno konzumirali prehrabene namirnice bogate folatima (120). Također se pretpostavlja da na pojavu aneuploidije utječu izloženost pesticidima i atmosferskom onečišćenju (121,122).

1.5. Kromosomska nestabilnost u roditelja djece s Downovim sindromom

Genomska nestabilnost definira se kao iznimno visoka stopa genetičkih promjena nastalih tijekom staničnih dioba. S obzirom na razinu promjena u genomu razlikujemo kromosomsku nestabilnost, mikrosatelitnu nestabilnost te mutacije parova baza. Nakupljanje promjena u genomu putem različitih mehanizama dovodi do promjena na razini stanica uključujući promijenjeni izražaj gena, poremećaje proliferacije i diferencijacije stanica te pokretanje programirane smrti stanice. Genomska nestabilnost smatra se jednim od najvažnijih uzroka zloćudnih bolesti, starenja, ali i niza drugih stanja povezanih s promjenama u genomu (123). Povišena razina genomske nestabilnosti uočava se i u osoba s DS-om. Poznato je kako osobe s DS-om imaju povećan rizik oboljenja od ALL-a i AML-a, sklonost preuranjenom starenju te povišenu osjetljivost na izloženost različitim okolišnim čimbenicima kao što je rendgensko zračenje (31,33). Proučavanjem genomske nestabilnosti citogenetičkim metodama u limfocitima perifernih krvi ne nalazi se povećana razina mikronukleusa, niti nukleoplazmatskih mostova, ali se uočavaju oštećenja DNA primjenom komet-testa (124).

Kromosomska nestabilnost predstavlja povećanu učestalost promjena u broju i/ ili strukturi kromosoma, uzrokovanih naslijeđenim ili stečenim unutarnjim, ili vanjskim čimbenicima. Promjene u broju kromosoma (aneuploidije) kao posljedica unutarnjih čimbenika najčešće nastaju uslijed pogrješaka nastalih tijekom rekombinacije, nepravilne funkcije kinetohora i diobenog vretena te abnormalne regulacije staničnog ciklusa. Također, mogu biti uzrokovane i metilacijskim procesima ili gubitkom funkcije telomera (125,91). Kromosomska nestabilnost povezuje se s rizikom razvoja malignih bolesti, kroničnih gastrointestinalnih bolesti kao što su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest (126), a nalazi se i u nasljednim sindromima kao što su Bloomov sindrom, Fanconijeva anemija, Ataxia telangiectasia i Xeroderma pigmentosum (127). Poznato je i kako starenjem dolazi do povećanog broja pogrješaka tijekom mitotske diobe stanica što dovodi do pojave sve većeg broja aneuploidnih stanica. Kod žena se to posebno odnosi na nepravilnu raspodjelu kromosoma X (128).

Većina osoba s DS-om poslije 40. godine oboli od demencije Alzheimerova tipa (33), a pretpostavlja se da povišena izražajnost gena na kromosomu 21, točnije gena za prekursor amiloidnog proteina (engl. amyloid precursor protein, APP), utječe na poremećaj funkcije moždanih stanica i razvoj DAT-a (129). Međutim, Schupf i suradnici (130,131) uočavaju čak do pet puta veći rizik oboljenja od DAT-a i u žena koje su u mlađoj dobi imale trudnoću s DS-om. Autori pretpostavljaju kako te majke imaju veću sklonost nerazdvajanju kromosoma,

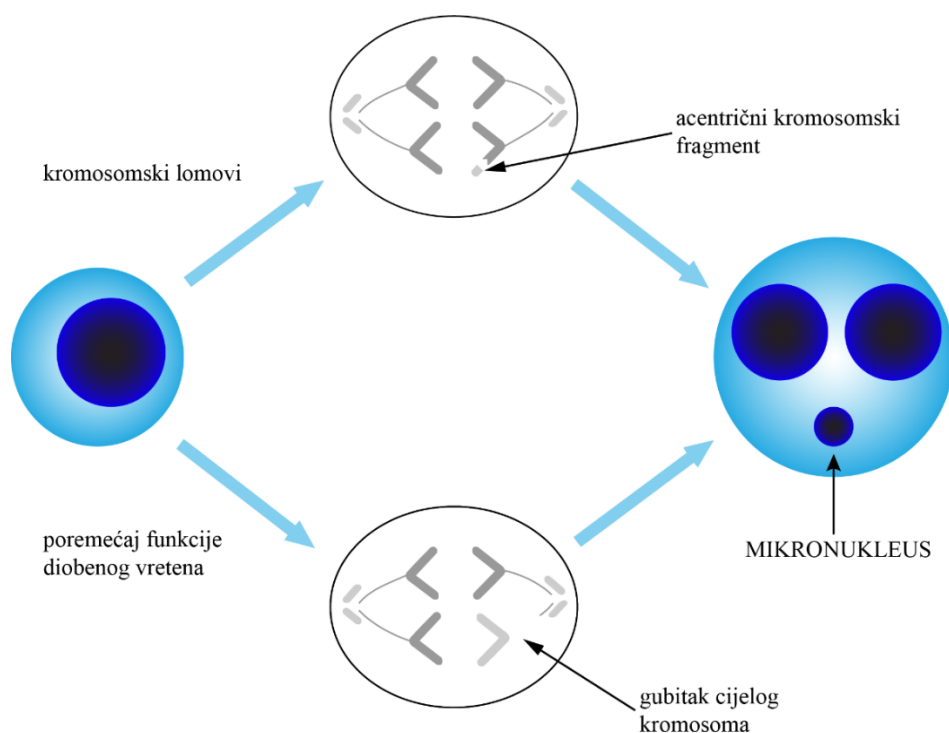
što posljedično dovodi do pojave trisomije 21 u moždanim stanicama i razvoja DAT-a. U prilog ovoj teoriji ide i istraživanje kojim je u uzorcima tkiva kore mozga osoba oboljelih od DAT-a utvrđena 10 puta veća učestalost trisomije 21 u odnosu na kontrolne uzorke. Suprotno, razina mozaicizma drugih kromosoma bila je jednaka kao i u kontrola (132).

Analizom perifernih krvi osoba zdrave populacije pomoću metode FISH, u gotovo svih osoba uočena je prisutnost malog broja stanica s trisomijom 21. Stoga se smatra da je u većine, ako ne i svih ljudi prisutan kriптиčki mozaicizam za trisomiju 21 (133). Međutim, u perifernim krvima fenotipski normalnih roditelja koji u svojoj anamnezi imaju jednu ili više uzastopnih trudnoća s DS-om uočava se značajno veći postotak stanica s trisomijom 21 (15-17). Povećan broj aneuploidnih stanica različitog kromosomskog podrijetla uočava se u perifernim krvima parova s većim brojem uzastopnih pobačaja (134), parova s većim brojem kromosomski abnormalnih plodova (135), te roditelja djece s trisomijom 13 ili 18 (136,137). Slični rezultati dobiveni su istraživanjima provedenim među parovima koji u svojoj anamnezi imaju trudnoću s trisomijom 21. Caria i suradnici (12) uočili su veću učestalost mikronukleusa induciranih mutagenima kod djece sa slobodnim oblikom DS-a, ali i kod njihovih roditelja. Nedavnim istraživanjima citogenetskih osobitosti perifernih krvi žena koje su u mlađoj dobi imale trudnoću s trisomijom 21, uočava se značajno veći broj pogrešnih razdvajanja kromosoma 21 (138,139). Nadalje, određivanjem učestalosti MN-a u limfocitima perifernih krvi roditelja djece s trisomijom 21, Silva-Grecco i suradnici (14) uočili su veću sklonost nerazdvajanju kromosoma ne samo kod majki, već i kod očeva takve djece. Također se pokazalo kako je kod parova koji su imali dvije trudnoće s trisomijom 21, učestalost mikronukleusa bila značajno viša nego kod onih sa samo jednom takvom trudnoćom. Fries i suradnici (17) uočavaju povišenu učestalost trisomije 21 u perifernim krvima mladih roditelja djece s DS-om te pretpostavljaju kako ti roditelji imaju sklonost nerazdvajanju kromosoma uzrokovanu ili genetičkom predispozicijom ili utjecajem okolišnih čimbenika. Ovim činjenicama ide u prilog i istraživanje Kovaleve (18) koja je utvrdila da parovi s više uzastopnih trudnoća sa slobodnim oblikom DS-a imaju veći postotak trisomičnih stanica među spolnim, ali i među somatskim stanicama. U konačnici, postavlja se hipotezu da ti parovi imaju veću sklonost nepravilnoj raspodjeli kromosoma i to ne samo kod mitotskog dijeljenja somatskih stanica, već i tijekom gametogeneze.

1.6. Mikronukleus metoda

Mikronukleuse u eritrocitima perifernih krvi, koje danas nazivamo Howell-Jolly-jevim tjelašcima, otkrili su krajem 19. stoljeća hematolozi William Howell i Justin Jolly. Tjelešca predstavljaju zaostalu jezgrinu DNA koja se nije izdvojila iz eritroblasta tijekom njihova sazrijevanja u koštanoj srži. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća Heddle (140) i Schmid (141) neovisno predlažu analizu MN-a kao jednostavan *in vivo* test za proučavanje utjecaja genotoksičnih tvari na nastanak kromosomskih oštećenja u uzorcima koštane srži. Kasnije se razvijaju *in vivo* i *in vitro* metode analize MN-a na različitim tipovima stanica. Mikronukleus-test na limfocitima periferne krvi prvi su opisali Countryman i Heddle (142), dok se danas najčešće upotrebljava modificirana metoda sa zaustavljenom citokinezom (engl. cytokinesis-block micronucleus assay, CBMN), koju su 1985. godine uveli Fenech i Morley (143).

Mikronukleus-test na limfocitima periferne krvi je citogenetska metoda koja omogućuje detekciju brojčanih kromosomskih promjena i poremećaja sinteze i funkcije diobenog vretena, kromosomskih lomova, strukturnih kromosomskih razmještanja, amplifikacije gena, inhibicije stanične diobe, nekroze i apoptoze. Mikronukleusi nastaju izdvajanjem acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi, koji se tijekom diobe nisu ugradili u jezgre stanica kćeri (slika 2). Analiza učestalosti MN-a provodi se nakon druge *in vitro* diobe sa zaustavljanjem citokineze citohalazinom B koji inhibira polimerizaciju aktina. Citohalazin B sprječava diobu citoplazme, ali ne i jezgara, što dovodi do nastanka višejezgrenih stanica. Mikronukleusi se analiziraju u binuklearnim stanicama, odnosno stanicama koje su završile jednu diobu jezgre. Prisutnost MN-a pokazatelj je postojanja poremećaja u prethodnoj diobi stanice te se stoga učestalost MN-a može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i brojčanih promjena kromosoma u stanicama, u uvjetima *in vitro* i *in vivo* pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari (19,144,145). Spontano povišeni broj MN-a javlja se kod osoba koje nisu izložene ksenobioticima u slučaju poremećaja mehanizama popravka DNA ili mehanizama vezanih uz aktivnost diobenog vretena, koji su od najvećeg značaja za predloženo istraživanje.



Slika 2. Shematski prikaz nastanka mikronukleusa izdvajanjem acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi.

Analizom učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama dobivaju se podatci o stupnju kromosomskih oštećenja i numeričkih kromosomskih aberacija nastalih *in vivo*, prije kultiviranja stanica. Suprotno, analizom MN-a u binuklearnim stanicama dobivaju se podatci o kromosomskim promjenama nastalim *in vivo*, ali i promjenama nastalim *in vitro* uslijed kultiviranja stanica. Smatra se kako učestalost MN-a u mononuklearnim stanicama predstavlja mjeru kromosomskih oštećenja nakupljenih tijekom godina u matičnim stanicama i cirkulirajućim limfocitima (145). S obzirom da se mikroskopskom analizom ne mogu razlikovati MN-i koji sadrže acentrične kromosomske fragmente od onih koji sadrže cijele kromosome, analiza sadržaja MN-a provodi se primjenom antikinetohornih protutijela (engl. Calcinosis Raynaud's phenomenon esophagial dismobility sclerodactility telangiectasia syndrome, CREST) ili češće metodom FISH uz upotrebu fluorescentno obilježenih proba specifičnih za pericentromerna kromosomska područja (146). Prilikom analize MN-a, istodobno se može utvrditi i broj nukleoplazmatskih mostova (engl. nucleoplasmic bridge, NPB) koji ukazuju na prisutnost dicentrika ili pogriješke u segregaciji kromosoma, te nuklearnih pupova (engl. nuclear buds, NBUD) kao posrednih pokazatelja amplifikacije gena. Pokretanjem međunarodnog projekta HUMN (engl. The International Collaborative Project

on Micronucleus Frequency in Human Populations) prepoznati su čimbenici koji utječu na nastanak MN-a te je provedena standardizacija metode. Dakle, MN-test se pokazao kao kompleksna, ali brza i jednostavna, odnosno idealna metoda za proučavanje kromosomske nestabilnosti.

1.6.1. Mehanizmi nastanka mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova

Mikronukleusi sadrže acentrične kromosomske ili kromatidne fragmente ili cijele kromosome koji se tijekom anafaze nisu vezali za diobeno vreteno i raspodijelili u jezgre stanica kćeri, već se okružuju zasebnom membranom tvoreći kromatinske strukture morfoloijom slične jezgri. Proučavanjem nastanka MN-a na mišjim embrijima uočava se kako MN-i nastaju isključivo nakon mitotske diobe stanica, odnosno da se nikada ne pojavljuju u istom staničnom ciklusu u kojem je stanica izložena X-zračenju ili genotoksičnom čimbeniku (147). Suprotno tome, sudbina MN-a tijekom daljnjih mitotskih dioba stanice nije sasvim razjašnjena. Jedna od teorija je da MN-i bivaju izbačeni iz stanice uslijed nemogućnosti replikacije DNA, dok bi se prema drugoj MN-i koji sadrže kromosome s centromernom regijom mogli ugraditi u glavnu jezgru. Pretpostavlja se da bi se MN-i koji sadrže DNA sposobnu za replikaciju tijekom nekoliko dioba mogli zadržati u citoplazmi kao zasebne strukture (148). Smatra se i da se dio stanica koje sadrže MN-e eliminira procesom apoptoze (149).

Acentrični kromosomski fragmenti mogu nastati kao posljedica izostanka popravka lomova DNA uslijed velike količine oštećenja koja nadilaze kapacitete popravka stanice. Ipak, češće su uzrokovani nepravilnim djelovanjem nekog od mehanizama popravka dvolančanih lomova DNA kao što su homologna rekombinacija (engl. homologous recombination, HR) i nehomologno spajanje krajeva (engl. non-homologous end joining, NHEJ), ili mehanizma popravka jednolančanih lomova isjecanjem nukleotida. Acentrični fragmenti mogu nastati i kao ostatci kromosomskog materijala nastalog nakon pucanja NPB-a (150).

Uzroci anafaznog zaostajanja cijelih kromosoma i nastanka MN-a posljedica su različitih procesa koji su najčešće vezani uz nepravilnu funkciju diobenog vretena i kinetohora, nepravilnosti u centromernom i pericentromernom području kromosoma, ali mogu nastati i uslijed nefunkcioniranja centrosoma ili proteina koji sudjeluju u kontroli

staničnog ciklusa (125,151). Jedan od mehanizama kromosomskog zaostajanja je hipometilacija satelitne DNA u centromernim i pericentromernim područjima kromosoma, čime dolazi do dekonenzacije ponavljajućih sekvenci, a posljedično i do nemogućnosti stvaranja odgovarajućih veza između mikrotubula i kinetohora. Hipometilacija satelitnih regija povezuje se s nastankom strukturnih i brojčanih kromosomskih abnormalnosti u senescentnim stanicama (152), tumorskim te stanicama pacijenata sa sindromom imunodeficiencije, centromerne nestabilnosti i anomalija lica (engl. Immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome, ICF) (153,154). Do hipometilacije pericentromernog područja može doći i uslijed nedostatnog unosa folata ili mutacija u genima uključenim u metabolički put folata (155,156). Nadalje, pretpostavlja se da bi nerazdvajanje kromosoma mogle uzrokovati i mutacije u genima uključenim u regulaciju dinamike vezanja kinetohora i mikrotubula (157).

Nukleoplazmatski mostovi nastaju kao posljedica nemogućnosti raspodjele dicentričnih kromosoma u stanice kćeri, što dovodi do nastanka mosta obavijenog membranom koji se proteže između dvije jezgre u binuklearnoj stanici. Dicentrični nastaju nakon pogrešnog popravka lomova DNA (kao posljedica HR ili NHEJ dva kromosoma), nakon fuzije telomernih krajeva dvaju kromosoma ili uslijed nepravilnog razdvajanja sestrinskih kromatida u anafazi. U stanicama se uz NPB-ove nastale uslijed izostanka ili pogrešnog popravka DNA često nalaze i MN-i koji sadrže acentrične fragmente nastale tijekom krivog popravka (150). Povećana učestalost NPB-a uočava se nakon izloženosti stanica endogenim oksidantima, ionizirajućem zračenju, dimu cigarete, ali i uslijed nedostatka folata i selena (158-160). Smatra se kako pojava dicentrika u stanici dovodi do takozvanog BFB ciklusa (engl. breakage-fusion-bridge, BFB). Tijekom anafaze dolazi do loma dicentričnog kromosoma i nastanka centričnih kromosomskih dijelova koji se tijekom idućeg staničnog ciklusa spajaju, ponovno tvoreći dicentrik. Ciklus se ponavlja, a uslijed pogrešnog spajanja ili lomova kromosoma koji nastaju, dicentrični se smatraju jednim od najčešćih uzroka kromosomske nestabilnosti (150). Međutim, u anafazi mogu nastati kromosomski mostovi kao posljedica pogrešne segregacije kromosoma (161). Pampalona i suradnici (162) uočavaju kako tijekom anafaze u većini slučajeva ne dolazi do lomova kromosomskih mostova, već ostaju netaknuti tijekom procesa mitoze. Kao mogući mehanizam navode odsutnost skraćivanja i/ ili produženje kinetohornih mikrotubula vezanih za dicentrick, što rezultira nepravilnom segregacijom kromosoma u jednu od stanica kćeri ili izdvajanjem iz jezgre putem MN-a. Nadalje, smatra se kako poremećaji funkcije proteina kondenzinskog i

kohezinskog kompleksa uzrokuju stvaranje anafaznih mostova, što posljedično dovodi do nastanka kromosomskih lomova ili nerazdvajanja kromosoma (163).

Nuklearni pupovi su malene strukture nalik mikronukleusima koje su nukleoplazmatskom vezom povezane sa staničnom jezgrom. Nuklearni pupovi služe kao indirektni pokazatelj amplifikacije određenih gena, a nastaju izdvajanjem amplificiranog segmenta iz stanične jezgre. Najčešće sadrže intersticijske ili terminalne acentrične dijelove kromosoma. No, smatra se da bi NBUD-ovi mogli predstavljati prijelaznu fazu u nastanku MN-a prilikom izdvajanja kromosoma iz jezgre (164). Pretpostavlja se i da bi NBUD-ovi mogli nastati kao posljedica izdvajanja cijelih kromosoma iz stanica nakon popravka pogriješke u broju kromosoma (engl. trisomic rescue) ili da nastaju nakon pucanja NPB-a (150).

1.6.2. Genetska predispozicija, utjecaj okolišnih čimbenika i životnih navika na učestalost mikronukleusa

Učestalost MN-a u limfocitima zdravih ispitanika pokazatelj je spontano nastalih oštećenja genoma nakupljenih tijekom života, nastalih djelovanjem endogenih čimbenika ili pod utjecajem životnih navika i drugih okolišnih čimbenika. Genotoksične tvari mogu potaknuti nastanak MN-a na dva načina. Aneugenim djelovanjem na komponente diobenog aparata dolazi do nerazdvajanja ili zaostajanja kromosoma, dok klastogenim djelovanjem MN nastaje od acentričnih fragmenata kromosoma nastalih uslijed kromosomskih ili kromatidnih lomova. Spontano povišeni broj MN-a najčešće nastaje uslijed poremećaja mehanizama popravka DNA, mehanizama vezanih uz aktivnost diobenog vretena, poremećaja funkcije diobenog aparata kao posljedice starenja ili uslijed oksidativnih procesa koji se odvijaju unutar stanica. Povećana učestalost MN-a povezuje se s mutacijama i polimorfizmima gena odgovornih za popravak DNA te gena uključenih u metabolizam ksenobiotika i metabolički put folata. Prisustvo određenih polimorfizama najčešće se uočava uslijed smanjene sposobnosti odgovora na utjecaj različitih okolišnih čimbenika (165). Tako se u osoba s prisutnim polimorfizmima gena koji sudjeluju u popravku DNA *XRCC1*, *XRCC3* (engl. X-ray repair cross complementing 1, 3) i *XPD* (engl. xeroderma pigmentosum group D) uočava povišen broj MN-a kao posljedica izloženosti zračenju iz radnog okoliša (166,167). Iako često istraživana, još uvijek nije sasvim razjašnjena veza polimorfizama gena glutathion S-transferaze Mu (engl. glutathione S-transferase Mu 1, *GSTM1*) i glutathion S-transferaze theta

(engl. glutathione S-transferase Theta 1, *GSTT1*) s izloženošću različitim genotoksičnim čimbenicima. Povišen broj MN-a zapaža se u nositelja *GSTM1*-nul genotipa izloženih duhanskom dimu i atmosferskom onečišćenju (168). Kirsch-Volders i suradnici (169) uočavaju kako je učestalost MN-a u nositelja *GSTT1*-nul genotipa ovisna o životnoj dobi. Pri tome u ispitanika izloženih genotoksičnim čimbenicima iz radnog okoliša u dobi od 20 godina nalaze znatno manji broj MN-a, u odnosu na ispitanike stare 60 godina. Nadalje, polimorfizam gena za aldehyd-dehidrogenazu 2 (engl. aldehyde dehydrogenase 2 family, *ALDH2*) povezuje se s porastom broja MN-a pod utjecajem alkohola (170). Uslijed izloženosti ionizirajućem zračenju, hidrogen peroksidu ili nedostatnom unosu folata povećan broj MN-a zapaža se u limfocitima nositeljica *BRCA1* i *BRCA2* (engl. BRCA1 and BRCA2, DNA repair associated) mutacija (171,172).

Veliki broj istraživanja potvrdio je ovisnost učestalosti MN-a i NPB-a sa životnom dobi ispitanika. Pretpostavlja se da je uzrok porasta kromosomske nestabilnosti s godinama života posljedica višegodišnje izloženosti okolišnim čimbenicima i nakupljanja pogrješaka u procesima regulacije popravka DNA te funkciji diobenog aparata stanice. Ispitivanjima porijekla MN-a uočeno je kako se s godinama povećava udio MN-a koji sadrže cijele kromosome, najvećim dijelom nastale kao posljedica nerazdvajanja spolnih kromosoma. Bukvic i suradnici (128) kromosom X nalaze u otprilike 22% MN-a starijih žena, u usporedbi s 1,7% u mlađih žena, dok u muškaraca uočavaju porast prisutnosti kromosoma Y s 1,6% do 10% u starijih muškaraca. Nadalje, nešto veći broj MN-a uočava se kod žena, što se pak objašnjava većom učestalošću nerazdvajanja kromosoma X (173,174).

Značajan utjecaj na razinu MN-a imaju i određene bolesti, a uglavnom se radi o oboljenjima koja se povezuju uz genomsku nestabilnost. Tako se povećani broj MN-a uočava u osoba oboljelih od kroničnih gastrointestinalnih bolesti, osoba s DS-om te sindromima kao što su Ataxia telangiectasia i Xeroderma pigmentosum (175-177). Kromosomska nestabilnost smatra se i jednom od osobitosti premalignih i malignih stanja. Povećana učestalost MN-a uočava se ne samo u osoba oboljelih od različitih malignih bolesti, već i u bliskih članova obitelji (178,179). Učestalost MN-a može se povezati i s prisustvom neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova bolest i DAT (180,181), te autoimunih bolesti poput dijabetesa tip 1 (182), multiple skleroze (183) ili reumatoidnog artritisa (184). Veća učestalost MN-a uočava se i u parova s problemima u reprodukciji kao što su veći broj spontanih pobačaja (134), jedna ili više trudnoća s kromosomski abnormalnim plodom (14,135) te parova s teškoćama pri začeću (185). Kromosomska nestabilnost povezuje se i sa stanjima

uzrokovanim trudnoćom: gestacijskim dijabetesom, trudnoćom uzrokovanom hipertenzijom (186), trombofilijom (187), uteroplacentalnom insuficijencijom te preeklamsijom (188).

Utjecaj životnih navika na pojavnost MN-a nije sasvim razjašnjen. Tako su i rezultati istraživanja o utjecaju duhanskog dima na razinu MN-a uglavnom kontradiktorni. Dok neka istraživanja upućuju na štetan utjecaj navike pušenja i porast broja MN-a u pušača, dio istraživanja nije dokazao takvu povezanost. Rezultati istraživanja provedenog u okviru projekta HUMN pokazuju statistički značajano povećanje broja MN-a tek u pušača koji puše više od 30 cigareta dnevno (189,190). Nadalje, učestala konzumacija alkohola povezuje se s porastom MN-a, uslijed štetnog djelovanja etanola, ali i drugih produkata nastalih tijekom metabolizma alkohola (170). Povećana učestalost broja MN-a povezuje se i sa svakodnevnom konzumacijom crnog čaja i većih količina kave (191). Poznato je kako su različiti vitamini i minerali neophodni za očuvanje stabilnosti genoma, sudjelujući u procesima zaštite i popravka DNA, prevenciji oksidativnog stresa te regulaciji metilacije. Fenech i suradnici (174) uočavaju vezu između povišenih vrijednosti MN-a i nedostatnog unosa kalcija, folata, beta-karotena, vitamina E, retinola, te unosa visokih doza vitamina B12, riboflavina i biotina. Autori prepostavljaju kako bi način prehrane, fizička aktivnost, ali i druge životne navike mogle imati utjecaj na razinu genomskih oštećenja, te kako bi se promjenom životnih navika moglo utjecati na prevenciju različitih bolesti i stanja.

Uslijed značajnog utjecaja na razinu MN-a kao kriterij isključenja u ovome istraživanju primjenjena je izloženost pesticidima i herbicidima, uzimanje određenih lijekova te izloženost ionizirajućem zračenju u posljednjih godinu dana. Brojna istraživanja pokazala su kako pesticidi, herbicidi te fungicidi uzrokuju kromosomska oštećenja i povećavaju rizik od razvoja neoplazija. Osim klastogenog učinka, neki pesticidi, ali i herbicidi kao što su terbutilazin i karbofuran te fungicidna sredstva kao što je karbendazim imaju i aneugeni učinak (192,193). Genotoksični učinak lijekova dokazan je za citostatike kao što su metotreksat, kolhicin, vinkristin ili vinblastin te neke taksane kao što je paklitaksel (194). Poznato je kako ionizirajuće zračenje uzrokuje jednolančane i dvolančane lomove kromosoma, modifikacije šećera i baza u molekuli DNA, nastanak apurinskih ili apirimidinskih mjesta, narušava strukturu DNA destabilizacijom vodikovih veza i pojavom drugih oštećenja. Djelovanje ionizirajućeg zračenja na molekule DNA može biti direktno, nastalo izravnim oštećenjem molekula DNA ili posredno djelovanjem slobodnih radikala (195). Uslijed striktnih propisa zaštite na radu i propisanih doza dijagnostičkog zračenja smatra se da izloženost ionizirajućem zračenju u propisanim uvjetima ne uzrokuje značajnija

oštećenja. Ipak u osoba sa smanjenom sposobnošću popravka DNA može uzrokovati značajan porast broja MN-a. Povećana učestalost MN-a uočava se i u djece izložene dijagnostičkom X-zračenju (196).

1.6.3. Indeks diobe jezgara (NDI)

Prilikom provođenja MN-testa odrediti se može i indeks diobe jezgara (engl. nuclear division index, NDI) koji služi kao pokazatelj brzine proliferacije stanica te upućuje na trajanje staničnog ciklusa u uvjetima *in vitro*. Prvenstveno, NDI se primjenjuje kao pokazatelj odgovora na stimulaciju diobe limfocita mitogenima te mjera citotoksičnosti. Pri određivanju NDI-a najmanja moguća vrijednost iznosi 1, a nalazi se u slučaju kada se niti jedna stanica tijekom procesa kultiviranja ne podijeli. U slučaju kada bi se sve stanice podijele jednom, odnosno da uslijed zaustavljene citokineze budu binuklearne, NDI bi bio 2. Više vrijednosti NDI-a upućuju da su se stanice podijelile veći broj puta, odnosno nalaze se stanice s tri ili više jezgara (19).

Značajno niže vrijednosti NDI-a uočavaju se kod raznih malignih oboljenja kao što su karcinom debelog crijeva i karcinom pluća (197), ali i kod kroničnih oboljenja koja uključuju upalne procese (198). Smatra se da stanice koje sadrže genomska ili kromosomska oštećenja imaju veću vjerojatnost ulaska u apoptozu ili nekrozu te smanjenu sposobnost diobe. Pokazalo se i da aneuploidne stanice u uvjetima *in vivo* i *in vitro* imaju slabiji potencijal rasta u odnosu na euploidne stanice. S obzirom da se NDI smatra biomarkerom citotoksičnosti niže vrijednosti NDI-a nalaze se i kao posljedica izloženosti okolišnim čimbenicima. Minozo i suradnici (199) niže vrijednosti NDI-a u osoba profesionalno izloženih olovu objašnjavaju s više teorija. Prema jednoj, niže vrijednosti NDI-a mogle bi biti posljedica većeg broja stanica koje su ušle u nekrozu ili apoptozu uslijed oštećenja DNA nastalih djelovanjem olova. Navode i kako bi uslijed genotoksičnog djelovanja olova moglo doći do odgode stanične diobe ili do smanjene proliferacije stanica dolazi zbog brojčanih kromosomskih promjena nastalih posrednim klastogenim djelovanjem olova.

1.7. Test izazova mitomicinom

Kao posredni pokazatelji uspješnosti popravka DNA koriste se testovi osjetljivosti na mutagene u kulturi limfocita periferne krvi. Uslijed djelovanja mutagena u stanicama dolazi do genomskih oštećenja, dok će količina nastalih oštećenja ovisiti o osjetljivosti stanice na djelovanje mutagena, te o sposobnosti stanice za popravak nastalih oštećenja. Dakle, individualne razlike u osjetljivosti na izloženost mutagenu dovode do nakupljanja različite količine genomskog oštećenja, odnosno više razine genomске nestabilnosti, a koja za posljedicu može imati razvoj niza zloćudnih bolesti (200). Smatra se kako razlike u osjetljivosti na mutagen mogu biti posljedica izloženosti vanjskim štetnim utjecajima ili genetske predispozicije, odnosno nefunkcionalnosti gena uključenih u mehanizme popravaka DNA (201,202). Testovi osjetljivosti na mutagene pokazali su se kao jednostavni, osjetljivi i pouzdani biomarkeri za procjenu rizika razvoja bolesti povezanih s genomskom nestabilnošću (200).

Jedan od takvih standardnih testova je i test osjetljivosti na mitomicin kojim se određuje sposobnost stanica za popravak pogrešaka nastalih nakon izlaganja mutagenu mitomicinu C (MMC) (203). Osim neposrednog oštećenja molekule DNA, MMC uzrokuje stvaranje kovalentnih veza između komplementarnih lanaca DNA, vežući se na gvaninske ostatke 5'-CG-3' sekvence u malom utoru DNA. Dakle, kao bifunkcionalni alkilirajući agens uzrokuje ukriženo (unakrsno) povezivanje komplementarnih lanaca DNA, što posljedično dovodi do kromosomskih lomova ili delecija. Mehanizmi kojima se popravljaju pogreške nastale ukriženim vezanjem lanaca DNA nisu sasvim razjašnjeni. No, smatra se da se zasnivaju na dva osnovna načina djelovanja: procesima homologne rekombinacije koja nije sklona pogreškama te procesu sinteze translezije (204). Iako se MMC primarno smatra klastogenom, dokazan je i njegov aneugeni učinak (205). Istraživanjem kromosomskog sadržaja MN-a nakon izlaganja MMC-u, kao mogući mehanizmi djelovanja na nerazdvajanje ili gubitak kromosoma navode se kromosomski lomovi u pericentromernom području te povećan stupanj dekondezacije heterokromatinskih regija (206).

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

1. Parovi koji su u mlađoj životnoj dobi imali trudnoću sa slobodnim oblikom Downova sindroma imaju veću sklonost nepravilnom razdvajanju kromosoma tijekom mitotske diobe limfocita periferne krvi.
2. Istu sklonost nerazdvajanju kromosoma navedeni parovi imaju i u spolnim stanicama.
3. Učestalost mikronukleusa mogla bi poslužiti kao biomarker za procjenu rizika nastajanja numeričkih kromosomskih aberacija u idućim trudnoćama.
4. U mladim parova s trudnoćom sa slobodnim oblikom Downova sindroma u anamnezi postoje odstupanja u sposobnosti stanica za popravak pogrješaka nastalih nakon izlaganja mutagenu mitomicinu C.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ:

- Cilj ovog istraživanja je ispitivanje mogućnosti korištenja mikronukleus metode i FISH metode u procjeni rizika nastajanja numeričkih kromosomskih abnormalnosti u mladim ženama i njihovih partnera, koji u svojoj obiteljskoj anamnezi imaju trudnoću ili rođeno dijete s trisomijom 21.

SPECIFIČNI CILJEVI:

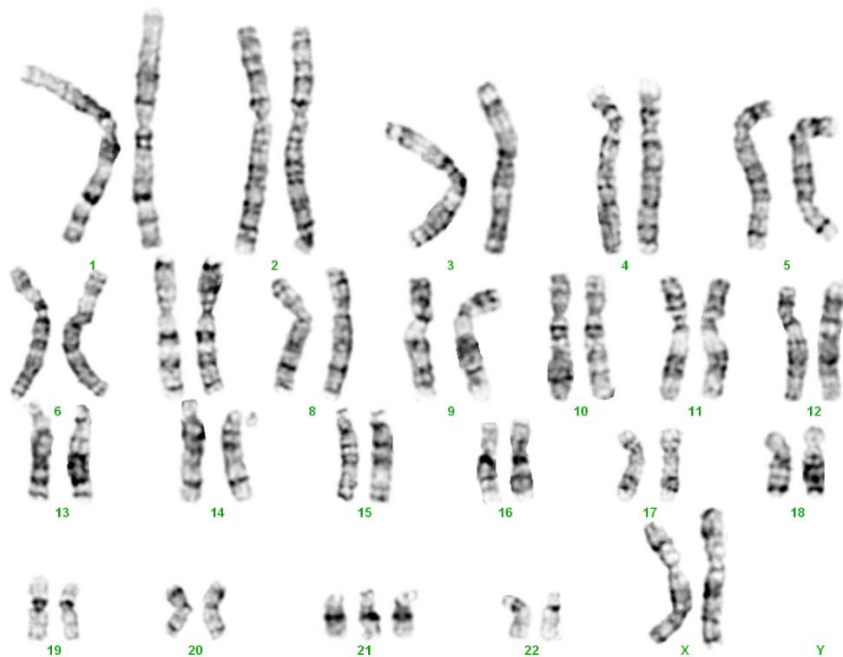
- Odrediti da li među mladim parovima u ispitivanoj skupini postoji povećana sklonost nerazdvajanju kromosoma prilikom mitotske diobe stanica periferne krvi korištenjem mikronukleus metode i FISH metode.
- U slučaju da istraživanje pokaže značajnu razliku u broju mikronukleusa između ispitivane i kontrolne skupine mladih parova, mikronukleus metoda bi se mogla predložiti kao prognostički biomarker. Pri tome bi se kod parova koji su imali u jednoj od prethodnih trudnoća trisomiju 21 pratile promjene molekularno-citogenetičkih osobitosti perifernih krvi, na temelju kojih bi se mogao odrediti relativni rizik ponavljanja trisomije 21, ali i drugih numeričkih kromosomskih poremećaja.
- Usporediti vrijednosti indeksa diobe jezgara u perifernim krvima parova ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu.
- Primjenom testa izazova mitomicinom usporediti sposobnost stanica za popravak pogrešaka nastalih nakon izlaganja mutagenu mitomicinu C između ispitivane i usporedne skupine.
- Ispitati postoji li povezanost između razine mikronukleusa i demografskih čimbenika, osobitosti medicinske i osobne anamneze, izloženosti okolišnim čimbenicima te životnim i prehrambenim navikama parova ispitivane i usporedne skupine, prikupljenih anketnim upitnikom.

4. ODABIR ISPITANIKA I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Odabir ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo 60 osoba ispitivane skupine, odnosno 30 parova (majke i očevi) koji su u dobi manjoj od 35 godina imali trudnoću ili dijete rođeno sa slobodnim oblikom DS-a (trisomija 21). Parovi uključeni u istraživanje upućeni su na prenatalnu dijagnostiku na Kliniku za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“ ili su ispitanice u našoj ustanovi rodile dijete s DS-om. U svih parova trisomija 21 utvrđena je citogenetskom analizom stanica korionskih resica ili plodove vode (slika 3) u slučaju prenatalne dijagnostike, ili kariotipizacijom perifernih krvi djece s DS-om.

Parovi usporedne skupine odabrani su među roditeljima kod kojih su majke u našoj ustanovi kontrolirale trudnoću i rodile dijete. Usporedna skupina obuhvatila je 30 parova (majke i očevi) s najmanje dva uredna poroda i bez povijesti spontanih pobačaja ili drugih reproduktivnih problema, te negativne obiteljske anamneze na kromosomske i genske poremećaje. Prosječna životna dob majki i očeva usporedne skupine usklađena je sa starosnom dobi žena i muškaraca ispitivane skupine.



Slika 3. Ženski kariotip sa slobodnim oblikom DS-a dobiven citogenetskom analizom kulture stanica plodove vode.

Svi parovi su prije pristupanja vađenju krvi ispunili anketni upitnik kako bi se dobio uvid u njihovu osobnu i obiteljsku anamnezu, te kako bi se utvrdili čimbenici koji mogu utjecati na učestalost javljanja MN-a (X-zračenje, infekcije, lijekovi, pušenje, uzimanje droga, konzumiranje kave, čaja, alkohola i vitamina, okolišni čimbenici).

Iz daljnjeg istraživanja isključeni su ispitanici kod kojih se utvrdilo da boluju od kroničnih bolesti, uzimaju određene lijekove ili su u posljednjih godinu dana imali akutnu infekciju. Također su isključeni parovi koji su bili izloženi pesticidima ili herbicidima, ili su u posljednjih godinu dana bili izloženi ionizirajućem zračenju kao što su rendgensko zračenje i kompjuterizirana tomografija (engl. computed tomography, CT).

Ispitivanja su provedena na uzorcima periferne krvi te je svim majkama i očevima ispitivane i usporedne skupine venepunkcijom uzeto 3 mL pune krvi u sterilni spremnik s antikoagulansom natrijevim heparinom (BD Vacutiner). Do obrade koja je provedena najkasnije unutar 24 sata, uzorci su pohranjeni u hladnjak pri temperaturi od 4°C. Kod parova ispitivane skupine uzorkovanju krvi pristupilo se u vremenskom razdoblju od najviše godinu dana nakon dijagnosticirane trudnoće s DS-om. Roditelji usporedne skupine u istraživanju su sudjelovali nakon poroda ili za vrijeme kontroliranja trudnoće.

Istraživanje je provedeno u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice "Sveti Duh" u razdoblju od siječnja 2015. godine do prosinca 2018. godine. Sudjelovanje ispitanika u istraživanju bilo je moguće tek nakon davanja pismene suglasnosti u vidu informiranog pristanka, što podrazumijeva da je ispitanik dobio i razumio sve potrebne informacije o istraživanju. Predloženo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice "Sveti Duh" i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a provedeno je u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja, sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju te zaštitu osobnih podataka ispitanika.

4.2. Metode

Sklonost pogrešnom razdvajanju kromosoma tijekom mitotske diobe u limfocitima perifernih krvi određivali smo uz pomoć molekularno-citogenetičkih metoda. U istraživanju su korištene sljedeće metode: mikronukleus-test, fluorescencijska *in situ* hibridizacija, te test izazova mitomicinom.

4.2.1. Mikronukleus-test

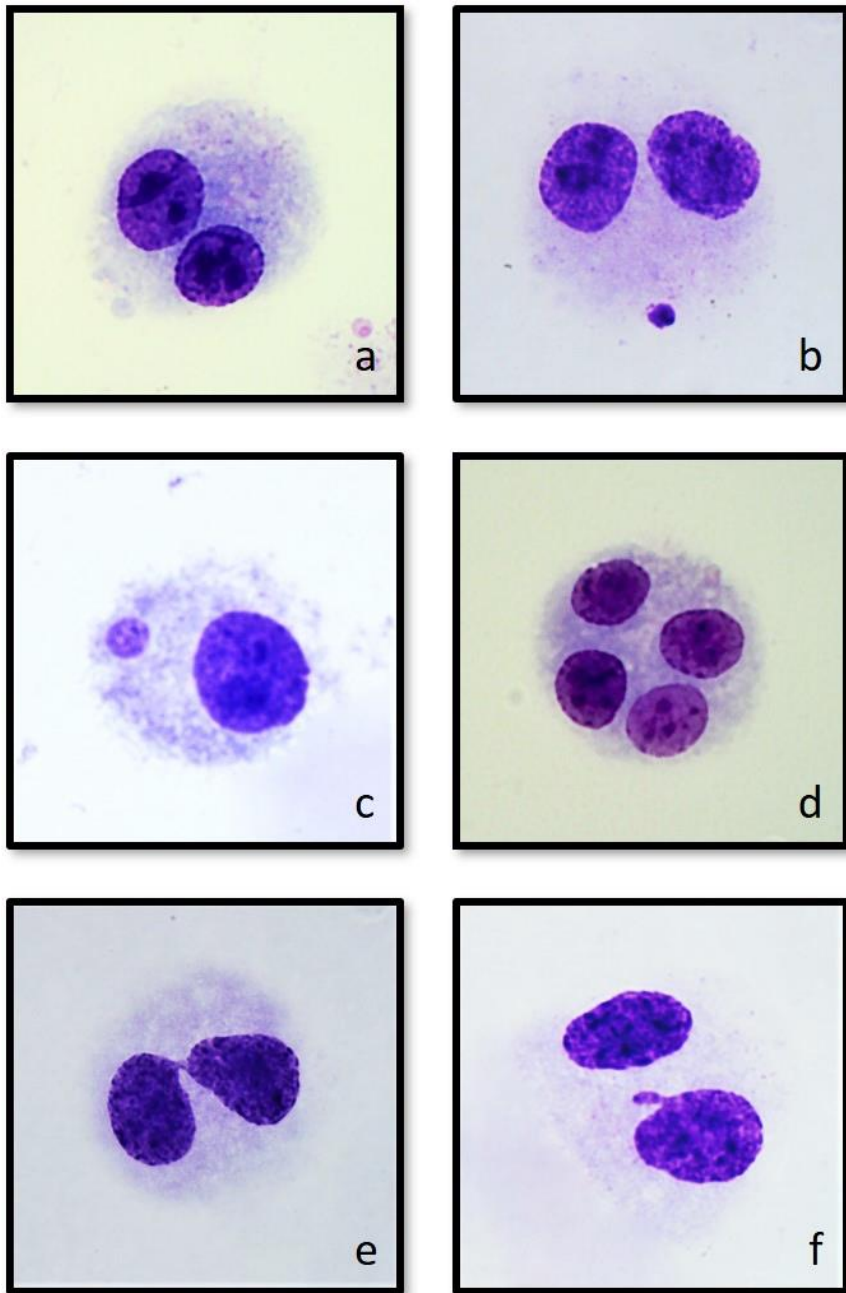
Za analizu MN-a primjenili smo *in vitro* metodu na limfocitima periferne krvi uz zaustavljenu citokinezu. Uzorak pune krvi svakog ispitanika uzgaja se u dvije odvojene stanične kulture. U 5 mL kompletnog hranilišta (PB-MAX karyotyping medium, Gibco) koji sadrži medij RPMI, fitohemaglutinin, teleći fetalni serum i L-glutamin doda se 0,5 ml pune krvi. Kultivacija se odvija tijekom 72 sata u inkubatoru za stanične kulture (Heraeus, HeraCell 240) pri temperaturi od 37°C i 5% CO₂. Radi sprječavanja diobe citoplazme nakon 44 sata dodaje se citohalazin B (gotova otopina u dimetil sulfoksidu koncentracije 10 µg/mL, Merck) u konačnoj koncentraciji od 3 µg/mL. Kultura se inkubira još 16 sati, nakon čega se epruvete centrifugiraju sedam minuta pri 800 okretaja u minuti. Nadtalog se odstrani, a stanična suspenzija se fiksira ispiranjem tri puta u fiksativu koji sadrži ledenu octenu kiselinu i metanol u omjeru 1 : 3 (Merck). Nakon posljednjeg centrifugiranja talogu se dodaje otprilike 0,5 mL svježeg fiksativa, te se suspenzija limfocita isti ili sljedeći dan nakapa na suha predmetna stakla. Preparati se suše preko noći na sobnoj temperaturi te se boje u 10%-tnoj otopini boje Giemsa (Merck) u fosfatnom puferu (Gurr Buffer Tablets, Gibco).

Preparati se analiziraju svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 1000 puta. Analiza mikronukleusa provodi se prema postupnicima kolaboracijskog projekta HUMN (158). U svakom uzorku analizirali smo po 1000 binuklearnih limfocita, odnosno po 500 binuklearnih limfocita iz svake od dviju staničnih kultura. Analiziraju se samo binuklearni limfociti sa sačuvanom membranom i citoplazmom te jezgrama koje se ne preklapaju (slika 4a). Mikronukleus se definira kao mala jezgra s promjerom između 1/16 do 1/3 glavne jezgre. Boje se istim intenzitetom kao i glavna jezgra te se prilikom analize mogu dodirivati, ali ne i preklapati s glavnom jezgrom (slika 4b).

Prilikom analize svakog uzorka odredi se:

1. *učestalost MN-a na 1000 binuklearnih stanica (ukupan broj MN-a na 1000 stanica)* (slike 4a i 4b);
2. *učestalost binuklearnih stanica s MN-ima na 1000 stanica;*
3. *raspodjela binuklearnih stanica s MN-ima*, odnosno broj stanica s jednim, dva ili više MN-a;
4. *učestalost MN-a na 1000 mononuklearnih stanica* (slika 4c);
5. *učestalost nukleoplazmatskih mostova na 1000 binuklearnih stanica* (slika 4e);
6. *učestalost nuklearnih pupova na 1000 binuklearnih stanica* (slika 4f);
7. *indeks diobe jezgara (NDI)*, određuje se analizom zastupljenosti stanica s jednom ili više jezgara (slika 4d) na 500 stanica, te se računa prema formuli (143):

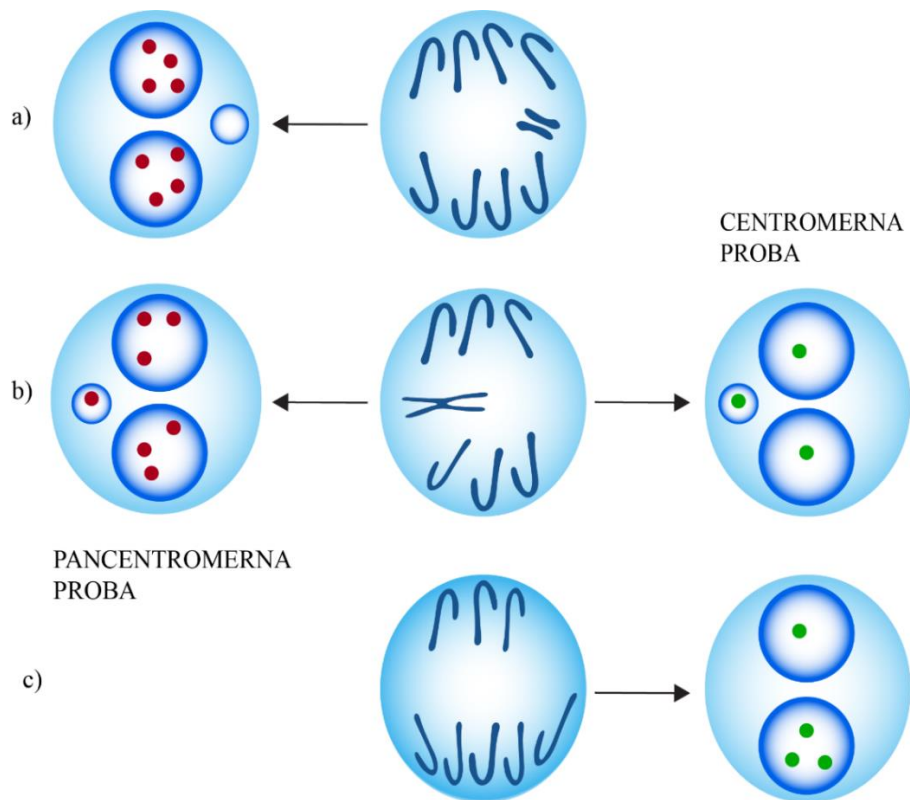
$$NDI = \frac{\text{broj mononukl. st.} + 2 \times \text{broj binukl. st.} + 3 \times \text{broj trinukl. st.} + 4 \times \text{broj tetraukl. st.}}{\text{ukupan broj stanica}}$$



Slika 4. Prikaz analize MN-testa. a) binuklearna stanica; b) binuklearna stanica s MN-om; c) mononuklearna stanica s MN-om; d) tetranuklearna stanica; e) NPB i f) NBUD u binuklearnim stanicama.

4.2.2. Fluorescencijska in situ hibridizacija (FISH)

S obzirom da se mikroskopskom analizom ne mogu razlikovati MN-i koji sadrže acentrične kromosomske fragmente od onih koji sadrže cijele kromosome, MN-test se nadopunjuje metodom FISH. Primjenom probe specifične za pericentromerna područja svih kromosoma (pancentromerna proba) omogućeno je utvrđivanje sklonosti nerazdvajanju sva 23 para kromosoma, dok se upotrebom proba specifičnih za kromosom 21 zasebno ispituje segregacija kromosoma 21 (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz FISH-analize s pancentromernom i centromernom probom specifičnom za određeni kromosom. Primjenom pancentromerne probe razlikujemo mikronukleuse koji sadrže acentrične fragmente (a) i cijele kromosome (b). Upotrebom probe specifične za centromeru određenog kromosoma ispituje se segregacija određenog kromosoma, pri čemu je moguće razlikovati da li se radi o zaostajanju (b) ili nerazdvajanju kromosoma (c).

Izvor: prilagođeno prema slici Fenecha i suradnika (159).

FISH-analiza provedena je u podskupini od 13 roditelja ispitivane skupine (osam žena i pet muškaraca) kod kojih je zamijećena najveća učestalost mikronukleusa. Iz usporedne skupine izdvojeno je 10 uzoraka majki i očeva koji omjerom prema spolu i prosječnoj dobi odgovaraju podgrupi ispitivane skupine.

FISH se provodi prema uputama proizvođača fluorescencijskih probi (Leica Biosystems, Germany), na preparatima pripremljenim prilikom obrade uzoraka perifernih krvi za potrebe MN-testa. Pri tome se dio stanične suspenzije nakapa na suha predmetna stakla koja se nakon sušenja na sobnoj temperaturi do obrade čuvaju na -20 °C.

Priprema preparata. Predmetna stakla se izvade iz frižidera te se osuše na sobnoj temperaturi. Zatim se inkubiraju dvije minute u otopini natrijeva citrata (2 x SSC, Merck) te pet minuta u 0,005%-tnoj otopini pepsina u 10 mM klorovodičnoj kiselini (HCl) (Leica Biosystems), prethodno zagrijanima na 37 °C. Slijedi inkubacija u fosfatnom puferu (1 x PBS, pH 7,4, Invitrogen) tijekom pet minuta na sobnoj temperaturi. Preparati se zatim fiksiraju 10 minuta u 1%-tnoj otopini formaldehida/1 x PBS/20 mM MgCl₂, te ispiru tijekom pet minuta u otopini 1 x PBS pri sobnoj temperaturi. Predmetna stakla se dehidriraju u seriji etanola rastuće koncentracije – po jednu minutu u 70%-tnom, 85%-tnom i 100%-tnom etanolu. Preparati se osuše na zraku.

Nanošenje FISH proba. U istraživanju smo koristili komercijalne FISH probe koje su direktno obilježene fluorokromima:

1. pancentromernu probu specifičnu za centromere svih kromosoma (My Probes, Cytocell)
2. centromernu probu 13/21 specifičnu za centromere kromosoma 13 i 21 (Kreatech FISH probes, Leica Biosystems)
3. probu specifičnu za lokus 21q22 (Kreatech FISH probes, Leica Biosystems).

Prema uputama proizvođača probe se zagriju na sobnu temperaturu, te se prije upotrebe epruvete lagano centrifugiraju, promiješaju vorteksiranjem te ponovno centrifugiraju. Pancentromerna proba razrijedi se s hibridizacijskim puferom u omjeru 1 : 1 te se po 5 µL probe nanese na dva predmetna stakla pripremljena iz dviju staničnih kultura istog ispitanika. Na suprotni kraj navedenih predmetnih stakala nanosi se 5 µL pomiješane centromerne probe 13/21 i probe specifične za lokus 21q22. Na predmetna stakla pažljivo se stave pokrovnice koje se pričvrste tekućim ljepilom.

Denaturacija i hibridizacija. Pripremljena stakla stavljaju se u uređaj za hibridizaciju (Thermobrite, Leica Biosystems) u kojem se odvija istovremena denaturacija FISH proba i preparata pri 75 °C tijekom pet minuta, a zatim i hibridizacija tijekom 72 sata u vlažnim uvjetima pri temperaturi od 37 °C.

Ispiranje preparata. Preparati se ispiru u otopini 0,4 x SSC/0,3% Tween 20 (Tween 20, 10%-tna vodena otopina, Merck), prethodno zagrijanoj na 73 °C, tijekom dvije minute, te otopini 2 x SSC/0,1% Tween 20 tijekom jedne minute. Preparati se zatim kratko ohlade u otopini 2 x SSC-a i dehidriraju u seriji etanola (70%, 85% i 100%), tijekom jedne minute u svakoj koncentraciji. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi na preparate se dodaje 10 µL otopine fluorescencijske boje DAPI (Leica Biosystems) te se stavi pokrovnica.

Analiza FISH preparata. Preparati se analiziraju fluorescencijskim mikroskopom povezanim sa softverskim sustavom Isis Fluorescence Imaging System (MetaSystems). Kod svakog ispitanika odredili smo učestalost MN-a s ili bez signala na 500 binuklearnih limfocita. Upotrebom pancentromerne probe određuje se učestalost nerazdvajanja svih kromosoma, dok se primjenom proba specifičnih za centromere 13/21 i lokus 21q22 zasebno ispituje segregacija kromosoma 21. Nadalje, učestalost nerazdvajanja kromosoma 21 analizirana je i u jezgrama 500 binuklearnih stanica bez mikronukleusa.

4.2.3. Test izazova mitomicinom

Upotrebom testa izazova mitomicinom određuje se sposobnost stanica za popravak pogriješaka nastalih nakon izlaganja mutagenu MMC-u. Metoda se temelji na utvrđivanju broja MN-a u limfocitima perifernih krvi koji su u *in vitro* uvjetima bili izloženi MMC-u, te usporedbi s vrijednostima dobivenim klasičnim MN-testom.

Test izazova mitomicinom provodi se na uzorcima pune krvi parova ispitivane i usporedne skupine. Dvije odvojene stanične kulture uspostavljaju se prema prethodno opisanom protokolu za MN-test na limfocitima perifernih krvi, pri čemu se u kulturu nakon 48 sati dodaje mitomicin C (Merck) u koncentraciji od 0,5 µg/mL (144). Prilikom analize preparata određuje se učestalost mikronukleusa na 1000 binuklearnih stanica te raspodjela MN-a u binuklearnim stanicama (broj stanica s jednim, dva ili više MN-a). Dobivene vrijednosti usporede se s učestalošću MN-a utvrđenih klasičnim MN-testom. Prema prethodno navedenoj formuli odredi se indeks diobe jezgara (NDI).

4.2.4. Anketni upitnik

Za prikupljanje demografskih podataka, obiteljske i medicinske anamneze te životnih i prehrambenih navika koristili smo upitnik kreiran iz više prethodno validiranih anketnih upitnika vezanih uz utvrđivanje utjecaja izloženosti genotoksičnim tvarima za vrijeme prenatalnog i postnatalnog perioda (projekt NewGeneris, Barcelona Institute for Global Health). Upitnik za majke i očeve razlikuje se utoliko što upitnik za očeve ne uključuje pitanja vezana uz reproduktivnu prošlost te tijek i ishod trudnoća (prilozi 1 i 2).

Anketni upitnik sadrži sljedeće podatke:

- sociodemografski podatci;
- obiteljska i medicinska anamneza (preboljene bolesti, infekcije, alergije, uzimanje lijekova, izloženost zračenju);
- reproduktivna prošlost (broj, tijek i ishod prethodnih trudnoća);
- prehrambene navike (način prehrane, uzimanje vitamina, minerala ili drugih dodataka prehrani);
- životne navike (konzumacija alkohola, kave, čaja, opojnih sredstava, pušenje);
- izloženost okolišnim čimbenicima na radnom mjestu i mjestu stanovanja.

Usporedbom podataka prikupljenih anketnim upitnikom i vrijednostima dobivenim MN-testom, ispitali smo postoji li povezanost između demografskih čimbenika, obiteljske i medicinske anamneze te životnih i prehrambenih navika, i učestalosti MN-a u parova ispitivane i usporedne skupine.

4.3. Statistička raščlamba

Statistička analiza provedena je korištenjem softverskih paketa Statistica (StatSoft, Inc. (2013). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com) te MedCalc verzija 18.11 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2018).

Veličina uzorka od 60 ispitanika po skupini dobivena je korištenjem podataka objavljenih u radu Silva-Grecco-a i suradnika (14). U navedenoj publikaciji autori postavljaju graničnu vrijednost od šest MN-a. Takva proporcija MN-a nađena je u znatno većem postotku u ispitivanoj skupini (u 88,5% majki i 77,8% očeva), nego u usporednoj skupini (29,2% majki odnosno 33,3% očeva). Uzorak izračunat na taj način pomoću metode opisane od Chow i suradnika (207) iznosi od 12 do 24 ispitanika po skupini uz granicu statističke značajnosti od 0,05 i snagu testa od 90%. Uzorak je naknadno povećan na ukupno 60 osoba (30 parova roditelja) kako bi se omogućila odvojena analiza majki i očeva te kako bi se izbjegli eventualni problemi u kvaliteti i raspoloživosti materijala.

Rezultati za kontinuirane varijable prikazani su kao aritmetička sredina (AS), standardna devijacija (SD), medijan (M), interkvartilni raspon (IQR) te raspon. Rezultati kategorijskih varijabli prikazani su kontingencijskim tablicama s apsolutnim brojevima i udjelom (%) od ukupnog broja opažanja za svaku varijablu ukupno te prema podskupinama. Raspodjela kontinuiranih varijabli među skupinama provedena je Mann-Whitney U-testom (za usporedbu ispitivane i usporedne skupine) te među podskupinama Kruskal-Wallis analizom varijance (ANOVA) uz post-hoc analizu. Raspodjela za kategorijske varijable među skupinama i podskupinama analizirana je hi-kvadrat testom. Odgovarajućim regresijskim modelom pokušat će se modelirati utjecaj prediktorskih varijabli na ishod istraživanja. Kako bi se utvrdila povezanost nezavisnih (prediktivnih) varijabli s ishodima (učestalost MN-a, NBUD-ova, NPB-a, MN-a u mononuklearnim stanicama i vrijednosti NDI-a) te s ishodima korištenjem drugih metoda (test izazova mitomicinom i FISH) provedena je Spearmanova korelacijska analiza. Kao prediktori za ishode (učestalost MN-a, NBUD-ova, NPB-a, MN-a u mononuklearnim stanicama i vrijednosti NDI-a) u multivarijatne regresijske modele uključene su: (1) unaprijed odabrane prediktivne varijable (1.2.2B – broj spontanih pobačaja, 1.3.6. – rendgensko snimanje u posljednjih 10 godina, 2.1.10. – konzumacija vitaminskih pripravaka s folnom kiselinom, 2.2.1. – konzumacija alkohola, 2.2.3. – pušenje, 2.2.6. – izloženost duhanskom dimu od strane ukućana, 3.1.4A - izloženost kemikalijama na radnom

mjestu (otapala, boje, adhezivna sredstva) korištenjem modela svih učinaka; te (2) prediktivne varijable koje su u univarijatnoj Spearmanovoj korelacijskoj analizi pokazale statističku povezanost uz $p \leq 0.10$ uz stupnjeviti unatražni pristup formiranja multivarijatnog modela. Za ishodišne varijable provedena je ROC (engl. receiver operating curve) analiza za usporedbu među skupinama. Kako je jedino za ukupan broj MN-a utvrđena statistički značajna dijagnostička vrijednost za navedenu je varijablu izračunata površina ispod ROC krivulje te granice povećanog rizika uz osjetljivost i specifičnost te prikazana ROC krivulja. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p=0,05$, uz odgovarajuću korekciju za višestruke usporedbe (Kruskal-Wallis ANOVA).

5. REZULTATI

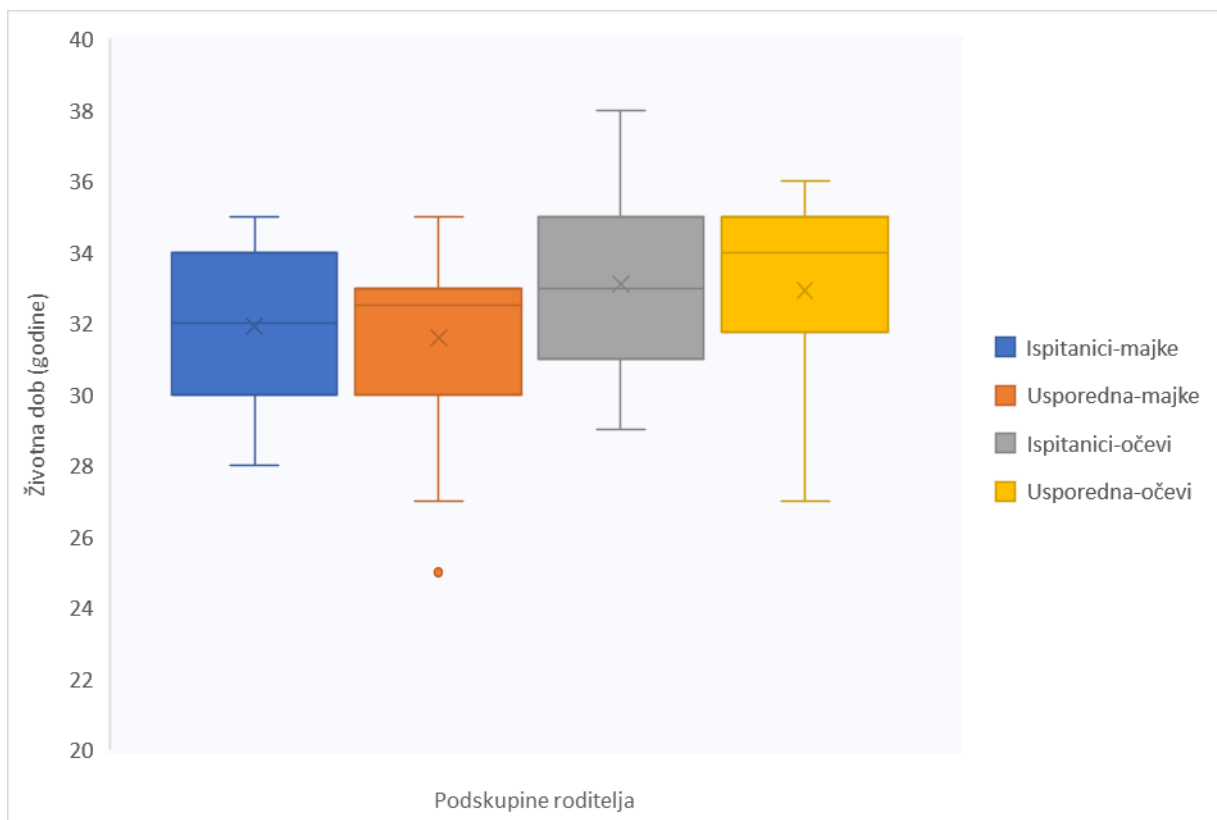
U istraživanje smo uključili 60 osoba ispitivane skupine, odnosno 30 parova (majke i očevi) koji su u dobi manjoj od 35 godina imali trudnoću ili dijete rođeno sa slobodnim oblikom DS-a (trisomija 21), te 30 parova usporedne skupine (60 osoba, majke i očevi) s najmanje dva uredna poroda i bez povijesti reproduktivnih problema. Metode MN-test na limfocitima periferne krvi i test izazova mitomicinom provedene su na uzorcima krvi svih parova ispitivane i usporedne skupine. Uslijed neadekvatnih preparata za analizu MN-a iz daljnjeg istraživanja isključena su tri para iz ispitivane skupine (majke i očevi) te su sve daljnje analize provedene na ukupno 54 roditelja, odnosno 27 parova ispitivane skupine i 30 parova usporedne skupine (60 osoba).

Nije bilo statistički značajne razlike u dobi između roditelja ispitivane i roditelja usporedne skupine (Mann-Whitney U=1593; z=0,153; p=0,878). Srednja dob roditelja ispitivane skupine iznosila je 32,5 godine, a roditelja usporedne skupine 32,3 godine. Ispitivana i usporedna skupina podijeljene su u dvije podskupine prema spolu: majke i očevi (tablica 3). Također nije bilo statistički značajne razlike u dobi između majki ispitivane i usporedne skupine (Kruskal-Wallis-test, vrijednosti z i p korigirane za višestruke usporedbe, z=0,348; p=1,000) te očeva ispitivane i usporedne skupine (Kruskal-Wallis-test, vrijednosti z i p korigirane za višestruke usporedbe, z=0,132; p=1,000). Raspodjela dobi roditelja svih podskupina prikazana je na slici 6.

Tablica 3. Usporedba životne dobi roditelja između ispitivane i usporedne skupine.

Skupina	N	Životna dob (godine)					p
		Min.	Maks.	25. perc.	Medijan	75. perc.	
Ispitivana	54	28,0	38,0	30,0	33,0	34,0	^a 0,878
Usporedna	60	25,0	36,0	31,0	33,0	34,5	
Majke							
Ispitivana	27	28,0	35,0	30,0	32,0	34,0	^b 1,000
Usporedna	30	25,0	35,0	30,0	32,5	33,0	
Očevi							
Ispitivana	27	29,0	38,0	31,0	33,0	35,0	^b 1,000
Usporedna	30	27,0	36,0	32,0	34,0	35,0	

N – broj osoba; ^aMann-Whitney U-test; ^bKruskal-Wallis-test, p-vrijednost (dvostrana) korigirana za višestruke usporedbe.



Slika 6. Raspodjela životne dobi majki i očeva ispitivane i usporedne skupine.

Podatci o trudnoćama parova ispitivane i usporedne skupine prikazani su u tablici 4. Statistički značajna razlika između ispitivane i usporedne skupine odnosila se na broj živorođene zdrave djece (Mann-Whitney $U=200$; $z=-0,859$; $p<0,001$) te veći udio parova ispitivane skupine koji su imali problema s neplodnošću (Pearson χ^2 -test 4,606; $df=1$; $p=0,032$). Pri tome je jedan par trudnoću ostvario nakon tri godine nezaštićenih odnosa, a drugi uz pomoć medicinski potpomognute oplodnje. Nije bilo statistički značajne razlike u pojavnosti komplikacija trudnoće kao što su trudnoćom uzrokovana hipertenzija, gestacijski dijabetes ili insuficijencija cerviksa između majki ispitivane i usporedne skupine. Od ukupno 27 parova ispitivane skupine, 26 ih je imalo jednu trudnoću sa slobodnim oblikom DS-a, dok jedan par ima živorođeno dijete s DS-om. Kariotipizacijom fetalnih stanica i limfocita periferne krvi rođenog djeteta, muški spol je nađen u 62,96%, a ženski u 37,04% analiziranih uzoraka (tablica 5). Prosječna gestacijska dob kada je postavljena dijagnoza DS-a iznosila je 15,6 tjedana trudnoće, dok je najčešća indikacija za prenatalnu dijagnostiku bio povišen rizik za trisomiju 21 dobiven kombiniranim probirom uz prisustvo ultrazvučnih biljega (48,15% majki).

Tablica 4. Usporedba kliničkih osobitosti i ishoda trudnoća između parova ispitivane i usporedne skupine.

	Ispitivana skupina	Kontrolna skupina	p
Broj trudnoća (sr. vrijednost ± SD) (raspon)	2,1 ± 0,9 (1 – 5)	2,2 ± 0,4 (2 – 3)	^a 0,281
Broj spontanih pobačaja (sr. vrijednost ± SD) (raspon)	0,2 ± 0,5 (0 – 2)	0	^a 0,089
Broj živorođene zdrave djece (sr. vrijednost ± SD) (raspon)	0,9 ± 0,6 (0 – 2)	2,2 ± 0,4 (2 – 3)	^a < 0,001*
Gestacijska dob poroda [¥] (sr. vrijednost ± SD) (raspon)	39,50 ± 0,94 (37 – 41)	39,30 ± 0,80 (37,5 – 40,5)	^a 0,097
Porodajna težina [‡] (sr. vrijednost ± SD) (raspon)	3425,79 ± 344,18 (2850 – 4100)	3397,17 ± 382,70 (2770 – 4720)	^a 0,514
Neplodnost[§] n (%)	4 (7,41)	0/60 (0)	^b 0,032*
Komplikacije trudnoće			
Bez problema N (%)	24 (88,89)	26 (86,67)	^b 0,800
Hipertenzija N (%)	0 (0)	3 (10,00)	^b 0,094
Preeklampsija N (%)	0 (0)	0 (0)	
Eklampsija N (%)	0 (0)	0 (0)	
Gestacijski dijabetes N (%)	2 (7,41)	1 (3,33)	^b 0,495
Insuficijencija cerviksa N (%)	1 (3,70)	0 (0)	^b 0,288

SD – standardna devijacija; n – broj ispitanika (majke i očevi); N – broj trudnica.

[¥]Srednje vrijednosti gestacijske dobi u terminu poroda živorođene djece izražene u tjednima trudnoće.

[‡]Srednje vrijednosti porodajne težine živorođene djece.

[§]Parovi koji su trudnoću ostvarili nakon više od godinu dana nezaštićenih odnosa i/ili sudjelovali u postupcima medicinski potpomognute oplodnje.

^aMann-Whitney U-test; ^bPearson χ^2 -test. *p<0,05.

Tablica 5. Prikaz osobitosti trudnoća s Downovim sindromom u parova ispitivane skupine.

Gestacijska dob (tjedni trudnoće)[‡] (srednja vrijednost ± SD) (medijan; raspon)	15,6 ± 4,8 (14,0; 12,0 – 38,0)
Indikacija za kariotipizaciju	
Biokemijski rizik + UZV N (%)	13 (48,15)
Samo biokemijski probir N (%)	4 (14,81)
Samo UZV N (%)	9 (33,33)
Rođeno dijete N (%)	1 (3,70)
Spol	
Muški N (%)	17 (62,96)
Ženski N (%)	10 (37,04)
Omjer spola (muški/ženski)	1,7

SD – standardna devijacija; N – broj parova.

[‡]Gestacijska dob u trenutku postavljanja dijagnoze DS-a.

5.1. Rezultati mikronukleus-testa

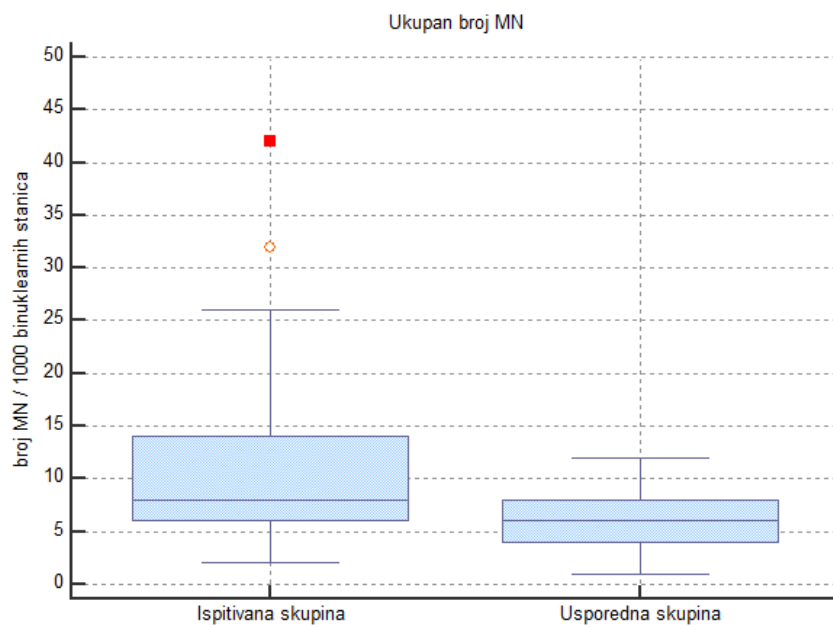
Učestalost MN-a te raspodjela MN-a u binuklearnim stanicama u ispitivanoj i usporednoj skupini te podskupinama majki i očeva prikazani su u tablici 6. Srednja vrijednost učestalosti MN-a na 1000 binuklearnih stanica u parova usporedne skupine iznosila je 6,1 (SD \pm 2,75; medijan 6 MN-a), dok je u parova ispitivane skupine nađen statistički značajno veća učestalost MN-a ($10,93 \pm 7,99$; medijan 8 MN-a na 1000 binuklearnih stanica) (Mann-Whitney U=967; $z=3,703$; $p<0,001$). Statistički značajno veće vrijednosti u parova ispitivane skupine utvrđene su i za učestalost binuklearnih stanica s MN-ima (Mann-Whitney U=972; $z=3,675$; $p<0,001$), broj stanica s jednim MN-om (Mann-Whitney U=909; $z=4,035$; $p<0,001$) i s dva MN-a (Mann-Whitney U=1213; $z=2,310$; $p=0,021$), dok nije bilo statistički značajne razlike u broju stanica s tri i više MN-a (slika 10a). Zasebnom usporedbom vrijednosti MN-a među podskupinama majki i očeva također se utvrdila statistički značajno viša učestalost MN-a kod majki ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu (Kruskal-Wallis-test, vrijednosti z i p korigirane za višestruke usporedbe, $z=3,030$; $p=0,015$). Majke ispitivane skupine imale su i statistički značajno veću učestalost binuklearnih stanica s MN-ima i broj stanica s jednim MN-om, dok nije uočena statistički značajna razlika za broj stanica s dva MN-a. Iako je kod očeva ispitivane skupine srednja vrijednost ukupnog broja MN-a bila viša u odnosu na ukupan broj MN-a kod očeva usporedne skupine ($9,07 \pm 5,64$ naprema $5,90 \pm 2,81$ na 1000 binuklearnih stanica), razlika nije bila statistički značajna (Kruskal-Wallis-test, vrijednosti z i p korigirane za višestruke usporedbe, $z=2,210$; $p=0,162$). Usporedba učestalosti MN-a na 1000 binuklearnih stanica između ispitivane i usporedne skupine te podskupina roditelja prikazane su na slikama 7, 8 i 9. Nije uočena statistički značajna povezanost između životne dobi roditelja i učestalosti MN-a na 1000 binuklearnih stanica ($p=0,784$).

Iako je u ispitivanoj skupini uočena veća učestalost MN-a u mononuklearnim stanicama u odnosu na usporednu skupinu, razlika nije bila statistički značajna (tablica 7). Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivane i usporedne skupine niti u učestalosti NPB-a i NBUD-ova na 1000 binuklearnih stanica. Ipak, Spearmanovom univarijantnom korelacijskom analizom uočena je pozitivna korelacija između ukupnog broja MN-a i učestalosti NPB-a ($\rho=0,54$; $p<0,001$) i MN-a u mononuklearnim stanicama ($\rho=0,72$; $p<0,001$). Vrijednosti NDI-a nisu se značajno razlikovale između ispitivane i usporedne skupine (Mann-Whitney U=1434; $z=-1,053$; $p=0,292$), niti zasebno između podskupina majki i očeva ispitivane i usporedne skupine (Kruskal-Wallis-test, $H_{3,114}=7,715$; $p=0,052$).

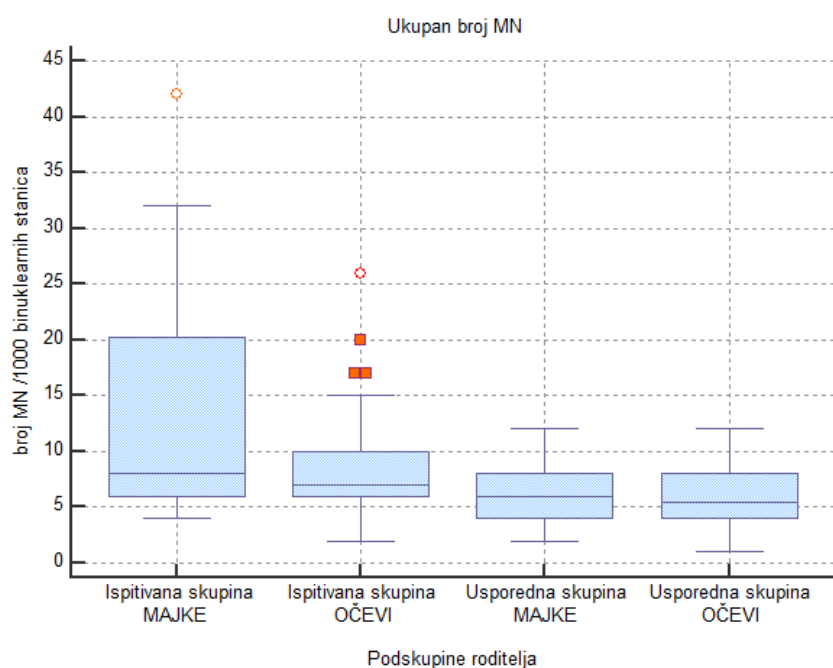
Tablica 6. Učestalost MN-a, učestalost binuklearnih stanica s MN-ima te raspodjela binuklearnih stanica s različitim brojem MN-a u ispitivanoj i usporednoj skupini te podskupinama majki i očeva.

Ukupno na 1000 binuklearnih st.	Srednja vrijednost	SD	Min.	Maks.	25. perc.	Medijan	75. perc.
ISPITIVANA SKUPINA (N=54)							
MN	10,93^a	7,99	2	42	6	8	14
CB s MN	9,00^a	5,65	2	31	5	7	12
CB s 1 MN	7,63^a	4,27	2	23	5	6	9
CB s 2 MN	1,07^a	1,10	0	4	0	1	2
CB s više MN	0,37	0,90	0	4	0	0	0
USPOREDNA SKUPINA (N=60)							
MN	6,10	2,75	1	12	4	6	8
CB s MN	5,50	2,15	1	11	4	5,5	7
CB s 1 MN	4,93	1,78	1	10	4	5	6
CB s 2 MN	0,58	0,81	0	3	0	0	1
CB s više MN	0,00	0,00	0	0	0	0	0
Ispitivana skupina – MAJKE (N=27)							
MN	12,78^b	9,56	4	42	6	8	21
CB s MN	10,67^b	6,85	4	31	6	8	16
CB s 1 MN	9,19^b	5,07	3	23	6	8	11
CB s 2 MN	1,11	1,09	0	3	0	1	2
CB s više MN	0,44	0,93	0	4	0	0	1
Usporedna skupina – MAJKE (N=30)							
MN	6,30	2,73	2	12	4	6	8
CB s MN	5,57	1,99	2	10	4	6	7
CB s 1 MN	4,90	1,60	2	9	4	5	6
CB s 2 MN	0,70	0,92	0	3	0	0	1
CB s više MN	0,00	0,00	0	0	0	0	0
Ispitivana skupina – OČEVI (N=27)							
MN	9,07	5,64	2	26	6	7	10
CB s MN	7,33	3,51	2	14	5	6	9
CB s 1 MN	6,07	2,53	2	12	5	6	7
CB s 2 MN	1,04	1,13	0	4	0	1	1
CBs više MN	0,30	0,87	0	4	0	0	0
Usporedna skupina – OČEVI (N=30)							
MN	5,90	2,81	1	12	4	5,5	8
CB s MN	5,43	2,33	1	11	4	5	7
CB s 1 MN	4,97	1,97	1	10	4	5	6
CB s 2 MN	0,47	0,68	0	2	0	0	1
CB s više MN	0,00	0,00	0	0	0	0	0

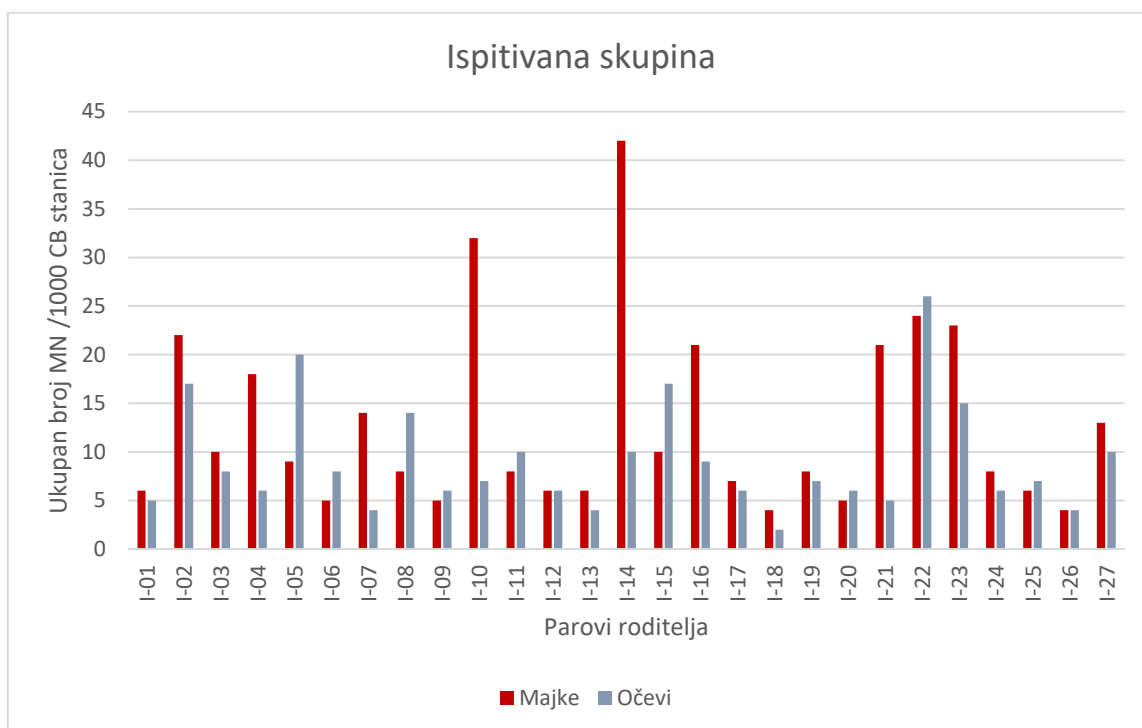
^aMann-Whitney U-test, $p < 0,05$ u odnosu na usporednu skupinu; ^bKruskal-Wallis-test, $p < 0,05$ u odnosu na majke usporedne skupine (vrijednost p korigirana za višestruke usporedbe). CB – binuklearna stanica; SD – standardna devijacija.



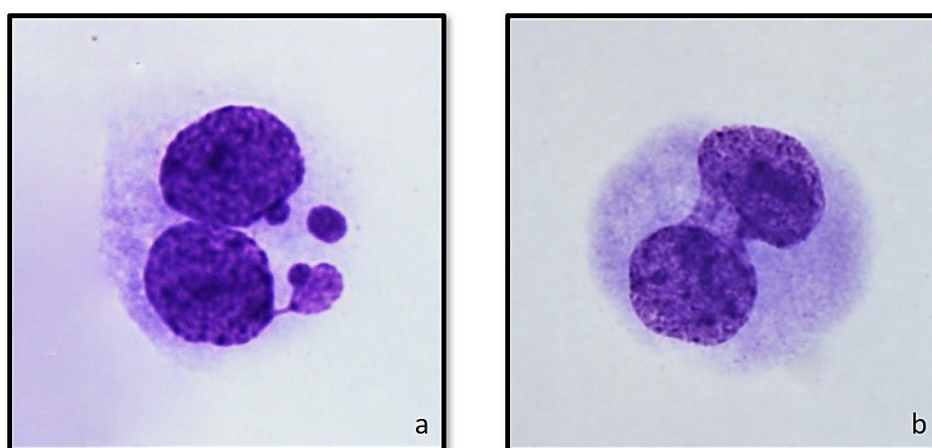
Slika 7. Usporedba učestalosti MN-a na 1000 binuklearnih stanica između ispitivane i usporedne skupine roditelja.



Slika 8. Usporedba učestalosti MN-a na 1000 binuklearnih stanica među podskupinama roditelja.



Slika 9. Prikaz učestalosti MN-a na 1000 binuklearnih stanica kod parova roditelja ispitivane skupine.



Slika 10. Prikaz rezultata MN-testa u parova ispitivane skupine: a) binuklearna stanica s četiri mikronukleusa; b) binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom.

Tablica 7. Učestalosti MN-a na 1000 mononuklearnih stanica, učestalosti NPB-a i NBUD-ova na 1000 binuklearnih stanica te vrijednosti NDI-a u ispitivanoj i usporednoj skupini.

	Srednja vrijednost	SD	Min.	Maks.	25. perc.	Medijan	75. perc.
ISPITIVANA SKUPINA (N=54)							
MN u MC	1,57	1,68	0	7	0	1	2
NPB	0,89	1,11	0	6	0	1	1
NBUD	0,61	1,07	0	5	0	0	1
NDI	1,91	0,12	1,65	2,2	1,83	1,9	1,95
USPOREDNA SKUPINA (N=60)							
MN u MC	0,97	0,92	0	4	0	1	1,5
NPB	0,73	0,94	0	4	0	0	1
NBUD	0,42	0,65	0	3	0	0	1
NDI	1,93	0,14	1,9	2,3	1,67	1,845	1,98

	Mann-Whitney U	z	p
MN u MC	1331	1,637	0,102
NPB	1495	0,707	0,480
NBUD	1550	0,394	0,693
NDI	1434	-1,053	0,292

CB – binuklearna stanica; MC – mononuklearna stanica.

5.2. Fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH)

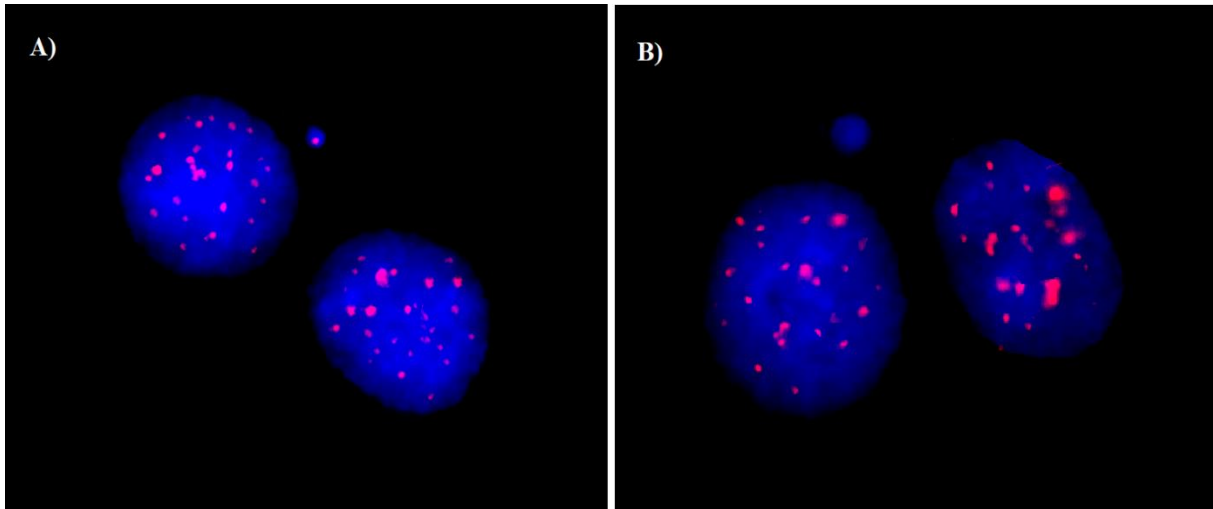
FISH-metodom analizirani su preparati dobiveni MN-testom kod 13 roditelja ispitivane skupine (osam majki i pet očeva) u kojih je nađen veći broj MN-a na 1000 binuklearnih stanica (raspon od 15 do 42 MN-a), dok je iz usporedne skupine odabrano 10 roditelja istog omjera spola i prosječne dobi (šest majki i četiri oca). Iako nije nađena statistički značajna razlika (Mann-Whitney $U=47,5$; $z=1,054$; $p=0,292$; tablica 8), FISH-analizom uz primjenu pancentromerne probe u ispitivanoj skupini je dobiven veći broj MN-a pozitivnih za centromeru: 57,1% (slika 11A), u odnosu na 51% MN-a kod roditelja usporedne skupine (tablica 8). Nije bilo statistički značajne razlike niti među podskupinama majki i očeva (Kruskal-Wallis-test, $H_{3,23}=4,800$; $p=0,187$). Primjenom probe za centromeru 13/21 i LSI 21q22 u ispitivanoj skupini je nađeno statistički značajno više MN-a koji sadrže kromosom 21 (pozitivni za centromernu probu 13/21 i probu LSI 21q22, slika 13) (Mann-Whitney $U=30,0$; $z=2,140$; $p=0,032$). Prisutnost signala isključivo za centromeru 13/21 upućuje da MN sadrži kromosom 13 ili samo centromerno područje kromosoma 21. Nije nađena statistički značajna razlika u udjelu MN-a pozitivnih za centromeru 13/21 između kontrolne i ispitivane skupine (Mann-Whitney $U=48,5$; $z=0,992$; $p=0,321$).

Osim analize sadržaja MN-a, probama za centromeru 13/21 i LSI 21q22 provedena je analiza nerazdvajanja kromosoma 21 u binuklearnim stanicama bez MN-a (slika 12). Pri tome je kod roditelja ispitivane skupine nerazdvajanje kromosoma 21 uočeno u 0,6% stanica, što je statistički značajno više u odnosu na 0,2% stanica kod parova usporedne skupine (Mann-Whitney $U=22,5$; $z=2,605$; $p=0,009$).

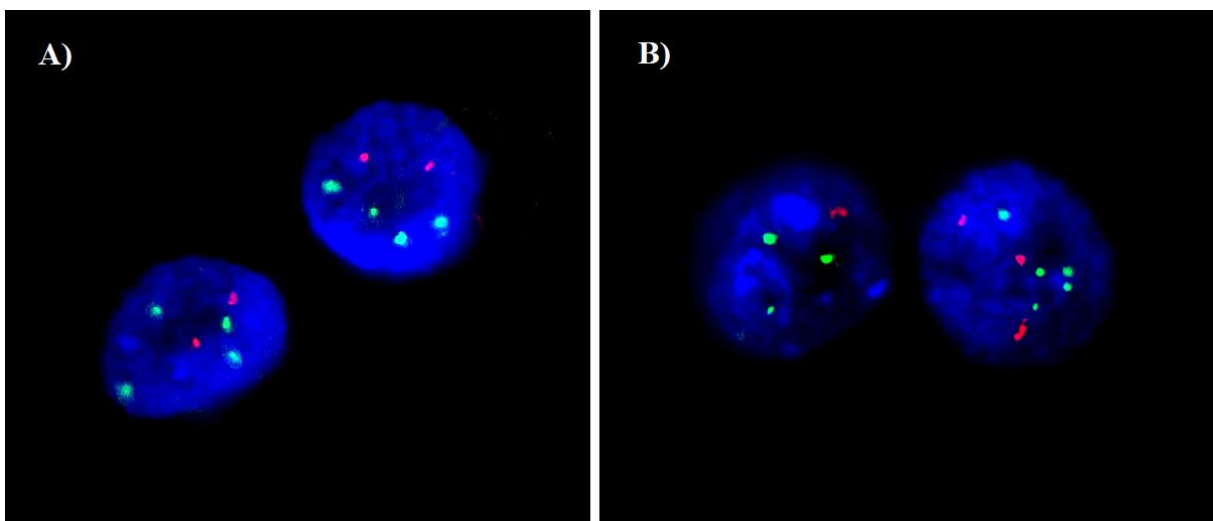
Tablica 8. Usporedba rezultata FISH-analize između ispitivane i usporedne skupine.

	Skupina	N	Sr. vr.	SD	Min.	Maks.	25. perc.	Medijan	75. perc.
PANCENTROMERNA PROBA									
Ukupno MN^a (%)	ispitivana	13	2,31	0,64	1,60	4,00	2,00	2,20	2,40
	usporedna	10	1,06	0,16	0,80	1,20	1,00	1,10	1,20
MN pozitivni za centromeru (%)	ispitivana	13	57,07	13,17	36,36	80,00	50,00	54,55	64,29
	usporedna	10	51,00	9,69	33,33	66,67	50,00	50,00	60,00
MN negativni za centromeru (%)	ispitivana	13	42,93	13,17	20,00	63,64	35,71	45,45	50,00
	usporedna	10	49,00	10,86	33,33	66,67	40,00	50,00	50,00
PROBA CEN 13/21 i LSI 21q22									
Ukupno MN^a (%)	ispitivana	13	2,17	0,77	1,20	4,20	1,80	2,00	2,40
	usporedna	10	1,00	0,13	0,80	1,20	1,00	1,00	1,00
MN pozitivni za cen 13/21 (%)	ispitivana	13	7,39	8,36	0,00	25,00	0,00	6,67	11,11
	usporedna	10	4,50	9,56	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00
MN pozitivni za cen 13/21 i LSI 21 (%)	ispitivana	13	5,92*	6,50	0,00	20,00	0,00	6,67	10,00
	usporedna	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				Mann-Whitney U	z	p			
PANCENTROMERNA PROBA ukupan broj MN				0,0	4,000	<0,001*			
PANCENTROMERNA PROBA MN pozitivni za centromeru				47,5	1,054	0,292			
PANCENTROMERNA PROBA MN negativni za centromeru				54,5	-0,620	0,535			
PROBA CEN 13/21 i LSI 21 ukupan broj MN				1,0	3,938	<0,001*			
PROBA CEN 13/21 i LSI 21 MN pozitivni za cen 13/21				48,5	0,992	0,321			
PROBA CEN 13/21 i LSI 21 MN pozitivni za cen 13/21 i LSI 21				30,0	2,140	0,032*			

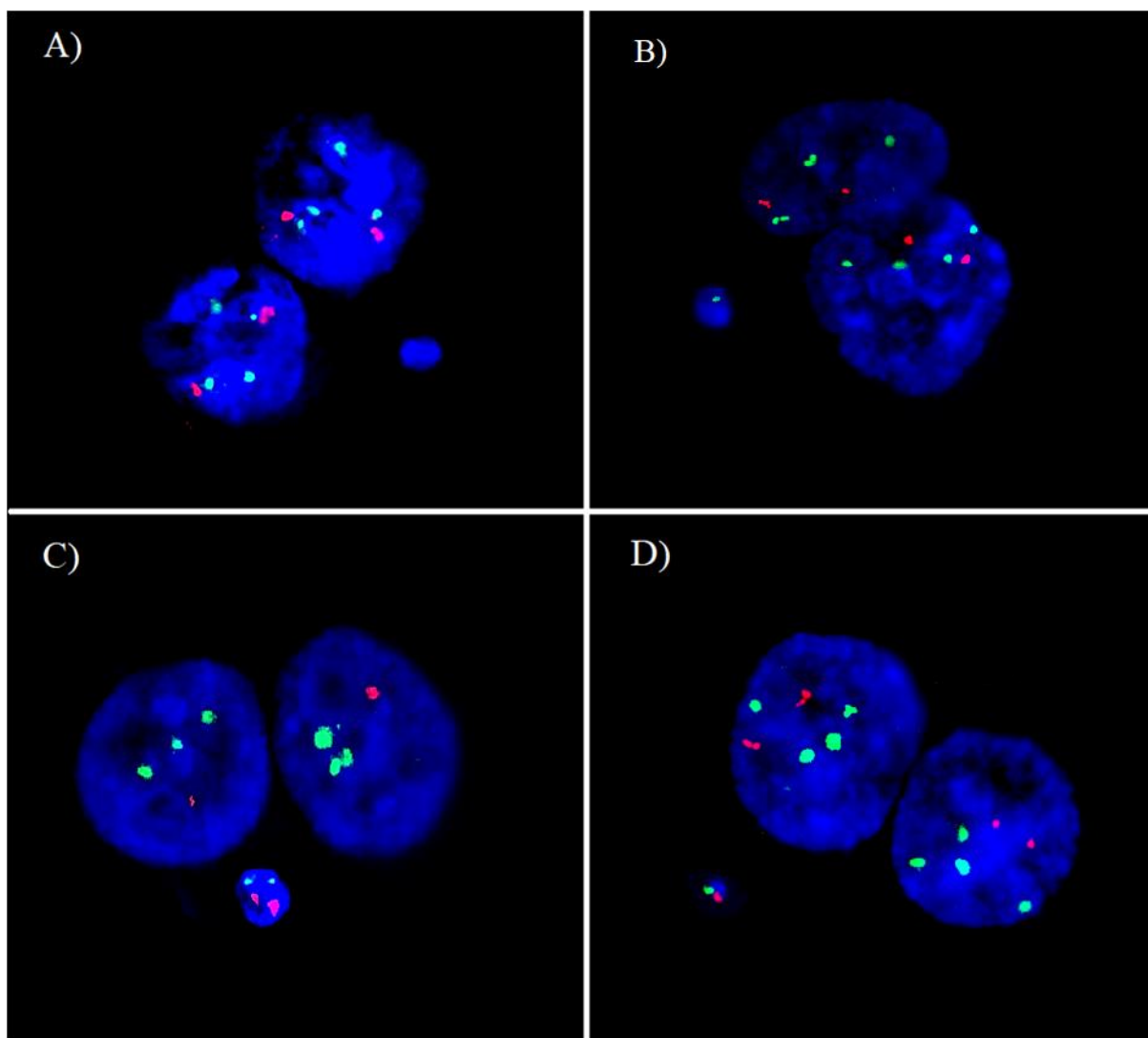
^abroj MN na 500 binuklearnih stanica (izražen u postotcima). *p<0,05.



Slika 11. FISH-analiza uz primjenu pancentromerne probe. A) Binuklearna stanica s MN-om pozitivnim za centromeru. B) Binuklearna stanica s MN-om negativnim za centromeru.



Slika 12. FISH-analiza na binuklearnim stanicama primjenom proba za centromeru 13/21 (zeleni signal) i LSI 21q22 (crveni signal). A) Četiri zelena signala (dvije centromere kromosoma 13 i dvije kromosoma 21) i dva crvena signala u obje jezgre upućuju na normalnu raspodjelu kromosoma 13 i 21. B) Tri zelena signala (centromere) i jedan crveni u jednoj jezgri te 5 zelenih signala i tri crvena signala u drugoj jezgri upućuju na nerazdvajanje kromosoma 21.



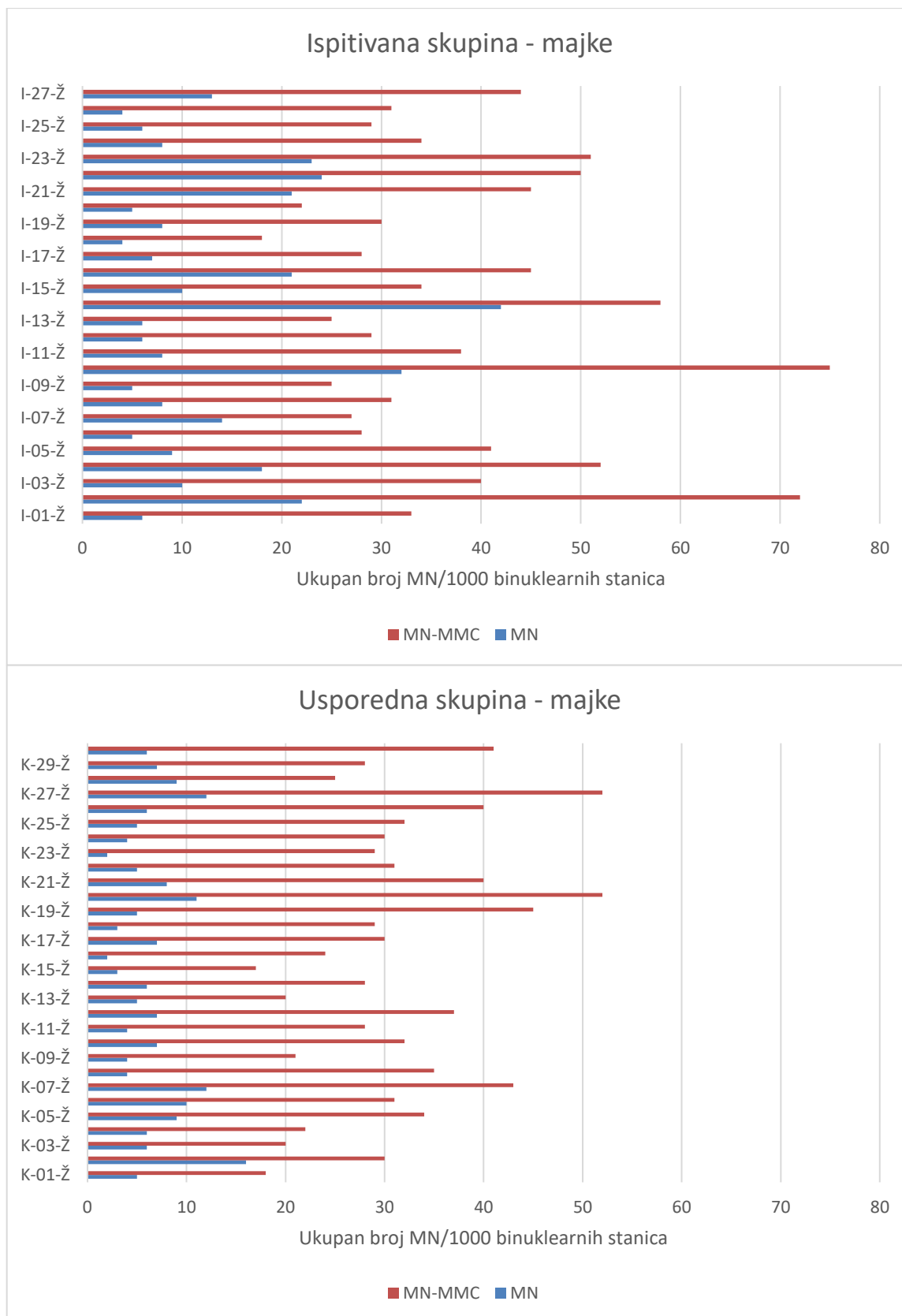
Slika 13. FISH-analiza MN-a primjenom proba za centromeru 13/21 (zeleni signal) i LSI 21q22 (crveni signal). A) Binuklearna stanica s MN-om negativnim za kromosome 13 i 21. B) Prisutnost zelenog signala i izostanak crvenog signala u MN-u upućuju da MN sadrži kromosom 13 ili centromerno područja kromosoma 21. C) i D) Crveni i zeleni signali u MN-u upućuju na prisutnost kromosoma 21.

5.3. Test izazova mitomicinom

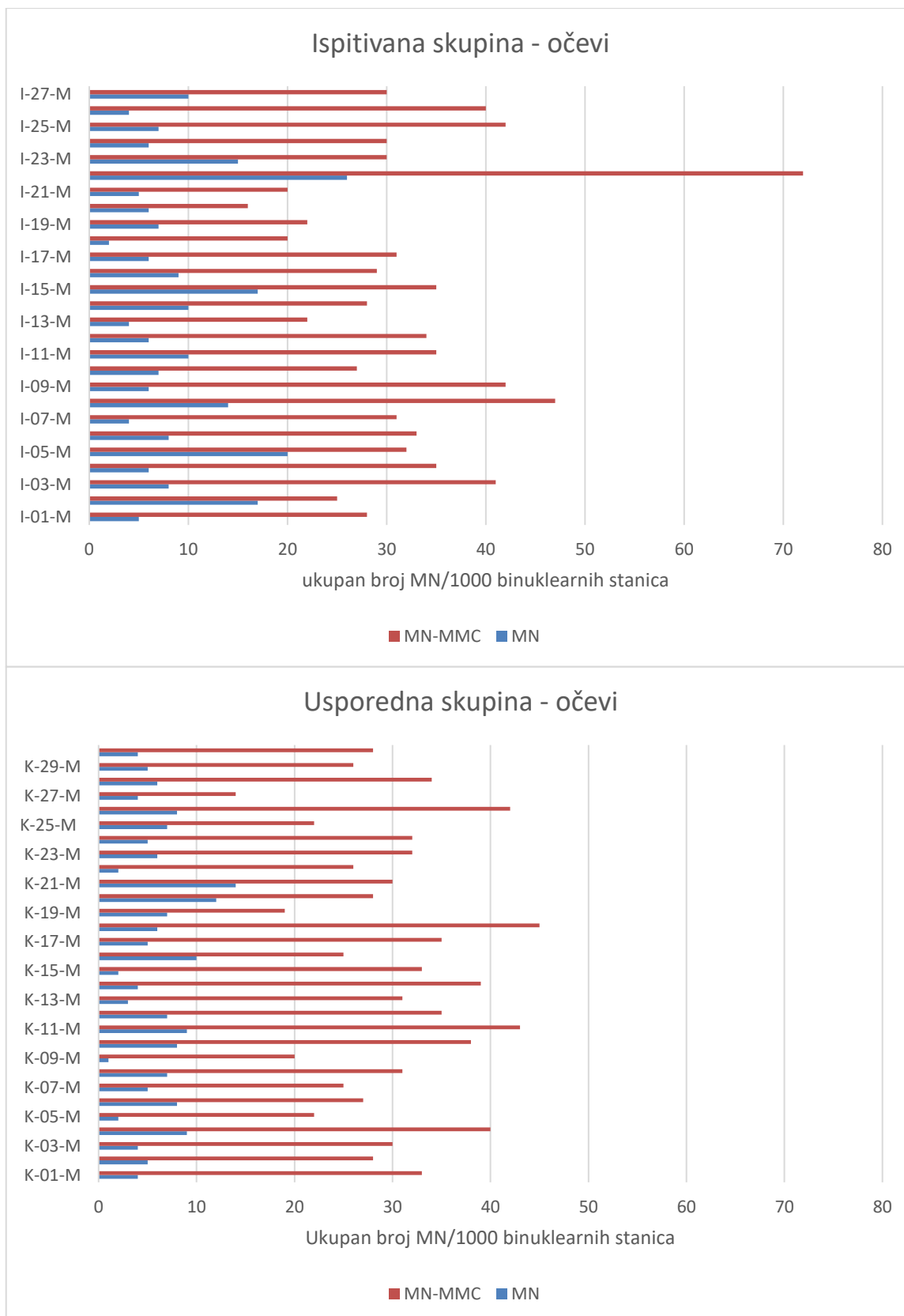
Kako bismo ispitali sposobnost stanica za popravak pogrješaka proveli smo test izazova mitomicinom kod roditelja ispitivane i usporedne skupine te su dobivene vrijednosti broja MN-a na 1000 binuklearnih stanica uspoređene s učestalošću MN-a dobivenih MN-testom (na 1000 binuklearnih stanica) (slike 14 i 15). Nakon izlaganja kulture limfocita MMC-u uočena je statistički značajno veća učestalost MN-a u binuklearnim stanicama kod parova ispitivane i usporedne skupine (Wilcoxonov test usklađenih parova, $p < 0,001$). Srednje vrijednosti MN-a nakon izlaganja MMC-u u ispitivanoj i usporednoj skupini te zasebno u podskupinama majki i očeva prikazane su u tablici 9. Nije bilo statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima ukupnog broja MN-a između ispitivane i usporedne skupine (Mann-Whitney $U=1362$; $z=1,464$; $p=0,143$), niti zasebnom poredbom između majki te zasebno očeva ispitivane i usporedne skupine (Kruskal-Wallis-test, $H_{3,114}=3,682$; $p=0,298$). Kako bi se utvrdio stvarni utjecaj MMC-a na nastanak MN-a, vrijednosti ukupnog broja MN-a induciranih MMC-om korigirane su oduzimanjem broja MN-a dobivenih klasičnim MN-testom. Usporedbom korigiranih vrijednosti broja MN-a induciranih MMC-om također nije bilo statistički značajne razlike između ispitivane i usporedne skupine (Mann-Whitney $U=1546,50$; $z=0,417$; $p=0,676$).

U ispitivanoj skupini nalazimo u 14,8% roditelja (8/54) broj MN-a induciranih MMC-om iznad gornje granične vrijednosti dobivene određivanjem 95. percentile za vrijednosti unutar usporedne skupine (45 MN-a na 1000 limfocita). Suprotno, u usporednoj skupini je broj MN-a iznad granične vrijednosti uočen samo u 3,3% (2/60) roditelja.

Usporedbom vrijednosti indeksa diobe jezgara nakon izlaganja MMC-u uočavaju se statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na vrijednosti NDI-a kod MN-testa (Wilcoxonov test usklađenih parova, $t=1,000$; $z=9,264$; $p < 0,001$, tablica 10, slika 16). Srednja vrijednost NDI-a nakon djelovanja MMC-om bila je za 17,8% niža u ispitivanoj skupini, te za 16,6% niža u usporednoj skupini, što upućuje da je MMC imao jednak citotoksični učinak na obje skupine.



Slika 14. Usporedba ukupnog broja MN-a dobivena MN-testom (MN) i testom izazova mitomicinom (MN-MMC) u usporednoj i ispitivanoj skupini majki.



Slika 15. Usporedba ukupnog broja MN-a dobivena MN-testom (MN) i testom izazova mitomicinom (MN-MMC) u ispitivanoj i usporednoj skupini očeva.

Tablica 9. Usporedba ukupnog broja MN-a dobivena testom izazova mitomicinom u ispitivanoj i usporednoj skupini.

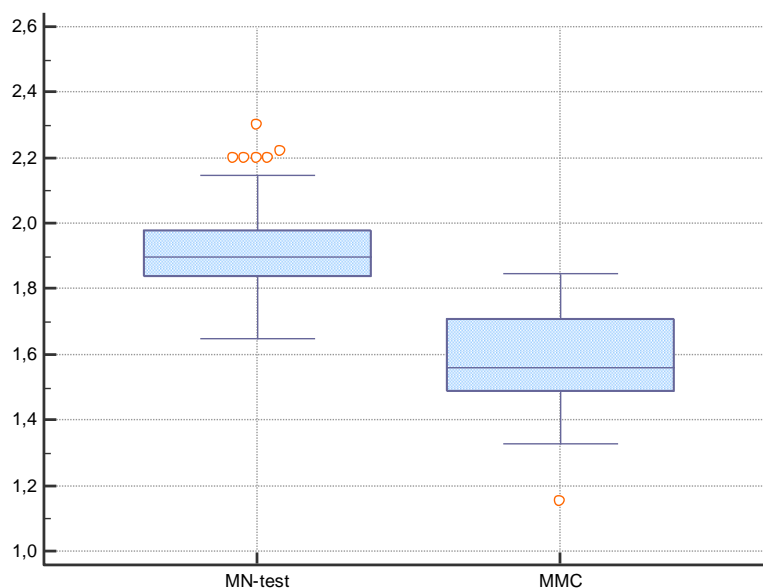
Skupina	N	Ukupan broj MN - MMC						p
		Srednja vrijednost	SD	Raspon	25. perc.	Medijan	75. perc.	
Ispitivana	54	35,04	12,72	16 - 75	28	31	41	^a 0,143
Usporedna	60	30,95	8,28	14 – 52	15	30	35	
Majke								
Ispitivana	27	37,59	14,08	18 -75	28	33	45	^b 0,298
Usporedna	30	31,47	9,19	17 – 52	25	30	37	
Očevi								
Ispitivana	27	32,48	10,86	16 – 72	27	31	35	^b 0,298
Usporedna	30	30,43	7,38	14 – 45	26	30,5	35	

N – broj osoba; ^aMann-Whitney U-test; ^bKruskal-Wallis-test.

Tablica 10. Usporedba vrijednosti indeksa diobe jezgara (NDI) kod testa izazova mitomicinom i MN-testa.

Skupina	N	NDI						p
		Srednja vrijednost	SD	Raspon	25. perc.	Medijan	75. perc.	
NDI - MN								
Ispitivana + Usporedna	114	1,92	0,13	1,65 - 2,30	1,84	1,90	1,98	^a <0,001*
NDI - MMC								
Ispitivana + Usporedna	114	1,59	0,14	1,15 - 1,85	1,49	1,56	1,71	
NDI - MN								
Ispitivana	54	1,91	0,12	1,65 - 2,20	1,83	1,90	1,95	^a <0,001*
NDI - MMC								
Ispitivana	54	1,57	0,15	1,15 - 1,80	1,45	1,56	1,70	
NDI - MN								
Usporedna	60	1,93	0,14	1,67 - 2,30	1,85	1,90	1,98	^a <0,001*
NDI - MMC								
Usporedna	60	1,61	0,13	1,33 - 1,85	1,51	1,59	1,71	

N – broj osoba; NDI - MN – vrijednosti NDI kod MN-testa; NDI - MMC – vrijednosti NDI kod testa izazova mitomicinom; ^aWilcoxonov test usklađenih parova. *p<0,05.



Slika 16. Raspodjela vrijednosti NDI dobivenih prilikom MN-testa i testa izazova mitomicinom.

5.4. Korelacija među ispitivanim biomarkerima

Univarijantnom korelacijskom analizom ispitali smo da li postoji povezanost među vrijednostima biomarkera određivanih MN-testom, FISH-analizom i testom izazova mitomicinom. Analizu smo proveli za rezultate dobivene kod svih roditelja ispitivane i usporedne skupine (114 roditelja). Učestalost MN-a statistički je značajno pozitivno korelirala s brojem NBUD-ova, NPB-a, brojem MN-a u mononuklearnim stanicama, učestalošću MN-a dobivenih testom izazova mitomicinom, brojem MN-a pozitivnih za kromosom 21 te učestalošću nerazdvajanja kromosoma 21 u binuklearnim stanicama. Prema Coltonovim smjernicama za utvrđivanje jačine veze (208), pokazana je povezanost srednje jačine s brojem NPB-a ($p=0,54$) i brojem MN-a u mononuklearnim stanicama ($p=0,72$). Statistički značajna negativna korelacija uočena je za vrijednost NDI kod MN-testa i testa izazova mitomicinom (tablica 11).

Također je ispitana i povezanost učestalosti NBUD-ova, NPB-a, MN-a u mononuklearnim stanicama, MN-a nakon djelovanja MMC-om te vrijednosti NDI-a s drugim parametrima dobivenim MN-testom, FISH-analizom i testom izazova mitomicinom. U tablici 12 prikazane su samo statistički značajne povezanosti. Učestalost NBUD-ova pozitivno je korelirala s učestalošću NPB-a i brojem MN-a u mononuklearnim stanicama, dok je negativna korelacija uočena s vrijednostima NDI-a. Učestalost NPB-a statistički je značajno pozitivno korelirala s brojem MN-a u mononuklearnim stanicama te udjelom MN-a negativnih za centromere svih kromosoma, dok je pozitivno korelirala s udjelom MN-a pozitivnih za centromeru 13/21 te pancentromernu probu. Pozitivna korelacija uočena je između učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama i udjela MN-a koji sadrže kromosom 21 (pozitivni za centromernu probu 13/21 i LSI 21q22).

Tablica 11. Povezanost učestalosti MN-a s vrijednostima dobivenim MN-testom, FISH-analizom i testom izazova mitomicinom.

Uspoređivani parametri	N	ρ	t(N-2)	p
učestalost MN & NBUD	114	0,29	3,165	0,002*
učestalost MN & NPB	114	0,54	6,756	<0,001*
učestalost MN & broj MN u MC	114	0,72	11,025	<0,001*
učestalost MN & NDI	114	-0,19	-2,050	0,043*
učestalost MN & MMC - ukupan broj MN	114	0,49	5,968	<0,001*
učestalost MN & MMC - NDI	114	-0,15	-1,640	0,104
učestalost MN & FISH PANCEN - MN pozitivni za centromeru	23	0,05	0,231	0,819
učestalost MN & FISH PANCEN - MN negativni za centromeru	23	-0,01	-0,030	0,976
učestalost MN & FISH 13/21 i LSI21 - MN pozitivni za cen 13/21	23	0,03	0,116	0,909
učestalost MN & FISH 13/21 i LSI2 1- MN pozitivni za cen 13/21 i LSI 21	23	0,46	2,379	0,027*
učestalost MN & udio CB s nerazdvajanjem kromosoma 21	23	0,44	2,260	0,035*

CB – binuklearna stanica; FISH PANCEN – FISH analiza provedena s pancentromernom probom; FISH 13/21 i LSI21 – FISH-analiza provedena s probom specifičnom za centromeru 13/21 i lokus specifičnom probom za 21q22 regiju; MC – mononuklearna stanica (engl. mononucleate cell); MMC – rezultati dobiveni testom izazova mitomicinom; N – broj ispitanika; ρ (ro) – Spearmanov korelacijski koeficijent. * $p < 0,05$.

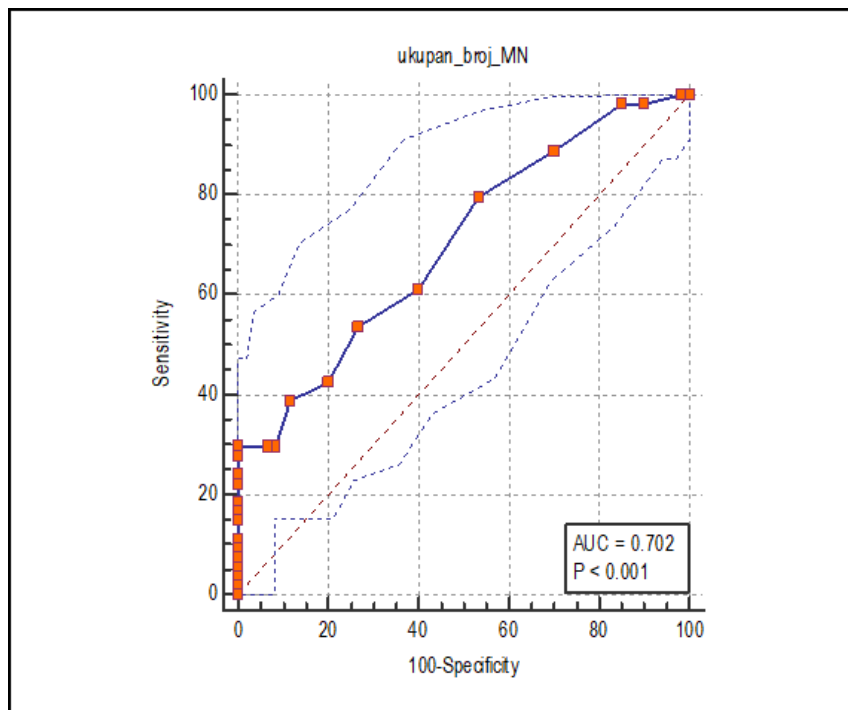
Tablica 12. Povezanost vrijednosti određenih MN-testom, FISH-analizom i testom izazova mitomicinom.

Uspoređivani parametri	N	ρ	t(N-2)	p
NBUD & NPB	114	0,37	4,180	<0,001*
NBUD & broj MN u MC	114	0,39	4,447	<0,001*
NBUD & NDI	114	-0,21	-2,266	0,025*
NPB & broj MN u MC	114	0,37	4,236	<0,001*
NPB & MMC-ukupan broj MN	114	0,27	2,909	0,004*
NPB & FISH PANCEN - MN pozitivni za centromeru (udio)	23	-0,50	-2,636	0,015*
NPB & FISH PANCEN - MN negativni za centromeru (udio)	23	0,47	2,423	0,024*
NPB & FISH 13/21 i LSI21 - MN pozitivni za cen 13/21	23	-0,55	-3,035	0,006*
NPB & udio CB s nerazdvajanjem kromosoma 21	23	-0,43	-2,196	0,039*
broj MN u MC & MMC - ukupan broj MN	114	0,34	3,869	<0,001*
broj MN u MC & FISH 13/21 i LSI21 - MN pozitivni za cen 13/21 i LSI 21	23	0,50	2,658	0,015*
NDI & MMC-NDI	114	0,53	6,638	<0,001*

CB – binuklearna stanica; FISH PANCEN – FISH-analiza provedena s pancentromernom probom; FISH 13/21 i LSI21 – FISH-analiza provedena s probom specifičnom za centromeru 13/21 i lokus specifičnom probom ua 21q22 regiju; MC – mononuklearna stanica; MMC – rezultati dobiveni testom izazova mitomicinom; N – broj ispitanika; ρ (ro) – Spearmanov korelacijski koeficijent. * $p < 0,05$.

5.5. Analiza krivulje osjetljivosti (ROC analiza)

Kako je jedino za ukupan broj MN-a utvrđena statistički značajna dijagnostička vrijednost, ROC (engl. receiver operating characteristic) krivulja je ispitivana samo za učestalost MN-a na 1000 binuklearnih stanica (ukupan broj MN-a) ($p < 0,001$). Utvrđena je granična vrijednost broja MN-a koja opisuje rizik pripadanja skupini roditelja koji će imati dijete ili trudnoću s DS-om (tablica 13). Veličina površine ispod krivulje iznosila je 0,702, pokazujući da će veći broj MN-a ukazivati na rizik začeca trisomije 21, u odnosu na 70,2% roditelja koji će ostvariti kromosomski normalnu trudnoću (slika 17). Površina ispod ROC krivulje mjera je točnosti testa te bi prema kategorizaciji naš test s veličinom površine ispod krivulje od 0,702 spadao u test osrednje osjetljivosti (209). Kao granična vrijednost utvrđen je ukupan broj MN-a > 12 , uz osjetljivost metode od 29,63% i specifičnost od 100% (tablica 13). Binarna logistička regresija pokazala je da majke i očevi kod kojih se nađe više od 11 MN-a imaju omjer vjerodostojnosti (engl. likelihood ratio, LR+) 4,44 puta veći ostvariti trudnoću s DS-om s 95% intervalom pouzdanosti od 1,6 do 12,5, u odnosu na roditelje kod kojih se nađu niže vrijednosti MN-a.



Slika 17. ROC krivulja predikcije ostvarenja trudnoće s DS-om obzirom na učestalost MN-a na 1000 binuklearnih stanica (ukupan broj MN-a).

AUC - površina ispod ROC krivulje (engl. area under the ROC curve)

Tablica 13. Rezultati ROC krivulje predispozije začimanja ploda s DS-om obzirom na ukupan broj MN-a.

Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,702
Standardna grješka	0,0483
95% interval pouzdanosti	0.609 to 0.784
z statistika	4,174
Razina značajnosti P	<0.0001
Youden indeks J	0,2963
95% interval pouzdanosti	0.1433 to 0.3889
Kriterij odabira (ukupan broj MN)	>12
95% interval pouzdanosti	>7 to >12
Senzitivnost	29,63
Specifičnost	100

5.6. Usporedba demografskih podataka, medicinske anamneze, životnih navika i izloženosti okolišnim čimbenicima između ispitivane i usporedne skupine

5.6.1. Sociodemografski podatci

Usporedbom sociodemografskih podataka uočili smo da je statistički značajno više parova usporedne skupine živjelo u kontinentalnim dijelovima Hrvatske, dok nije bilo značajne razlike u vrsti naselja u kojem su parovi stanovali (tablica 14).

Tablica 14. Usporedba sociodemografskih podataka između parova ispitivane i usporedne skupine.

	Ispitivana skupina	Usporedna skupina	p
	N (%)	N (%)	
Mjesto stanovanja			
Kontinentalna Hrvatska	42 (77,78)	60 (100,00)	<0,001*
Primorska Hrvatska	12 (22,22)	0 (0)	
Stambeno naselje			
Predgrađe	10 (18,52)	10 (16,67)	0,326
Gradsko naselje	36 (66,67)	46 (76,67)	
Seosko naselje	8 (14,81)	4 (6,67)	
Razina obrazovanja			
Srednja škola	22 (40,74)	28 (46,67)	0,863
Viša ili visoka škola	9 (18,5)	7 (11,67)	
Fakultet	22 (40,74)	24 (40,00)	
Doktorat znanosti	1 (1,85)	1 (1,67)	

N – broj ispitanika; * $p < 0,05$ (χ^2 -test 14,9; $df=1$; $p < 0,001$).

5.6.2. Medicinska anamneza

Analizom rezultata medicinske anamneze roditelja uočili smo da je jedan par usporedne skupine imao dijete koje je u posljednjih godinu dana preboljelo vodene kozice. Jedna majka ispitivane skupine imala je člana uže obitelji oboljelog od cerebralne paralize. Vezano uz bolesti sudionika istraživanja, kod dvije osobe ispitivane skupine uočena je hipertenzija, tri roditelja ispitivane te jedan usporedne skupine su imali poremećaj štitne žlijezde, jedna majka ispitivane skupine je preboljela tuberkulozu (prije četiri godine), u

jednog oca usporedne skupine je uočena kronična upala debelog crijeva, a u jednog oca ispitivane skupine psorijaza. Dakle udio navedenih stanja nije bio statistički značajan u odnosu na udio roditelja bez pojedinačnih navedenih bolesti. Vezano uz anamnezu malignih oboljenja kod jednog oca ispitivane skupine zabilježen je dobroćudni tumor štitne žlijezde, dok je 14,8% roditelja ispitivane i 8,33% roditelja usporedne skupine navelo maligno oboljenje u članova uže obitelji (χ^2 -test 1,18, df=1, p=0,277).

Niti jedan od roditelja uključenih u istraživanje nije u posljednjih godinu dana bio izložen dijagnostičkom neionizirajućem zračenju, dok je u posljednjih 10 godina na rendgenskom ili CT-snimanju bilo 35,2% ispitanika i 41,7% roditelja usporedne skupine (χ^2 -test 0,50, df=1, p=0,478). Jedna majka ispitivane skupine je u posljednjih godinu dana primila transfuziju krvi. Prisustvo alergijskih bolesti u ispitanika ili članova njihovih obitelji zabilježeno je u jednog oca ispitivane skupine i petero roditelja usporedne skupine. Samo je jedan roditelj usporedne skupine konzumirao lijekove u posljednjih godinu dana, za razliku od 10 (18%) roditelja ispitivane skupine (χ^2 -test 9,26, df=1, p=0,002). Lijekovi koje su uzimali roditelji ispitivane skupine uključuju antibiotike, antihipertenzive, hormone štitnjače, nesteroidne antireumatike, antihistaminike, antidepresive te kortikosteroidne kreme.

5.6.3. Životne navike i prehrana

Niti jedan roditelj uključen u istraživanje nije bio vegeterijanac, dok je 29,6% roditelja ispitivane i 13,3% roditelja usporedne skupine proizvodilo hranu kod kuće (χ^2 -test 4,54; df=1; p=0,034). Nije bilo statistički značajne razlike u tjednoj konzumaciji voća i povrća te konzervirane hrane između parova ispitivane i usporedne skupine. Suprotno, dobivena je statistički značajna razlika u konzumaciji crvenog i bijelog mesa pri čemu su statistički značajno više obroka crvenog mesa jeli roditelji usporedne skupine (χ^2 -test 9,26; df=3; p=0,002), dok su više obroka bijelog mesa jeli parovi ispitivane skupine (χ^2 -test 6,10; df=2, p=0,002). Između ispitivane i usporedne skupine nije bilo statistički značajne razlike u konzumaciji dodataka prehrani (folna kiselina, vitamini, minerali), dok su majke usporedne i ispitivane skupine znatno češće od očeva uzimale folnu kiselinu (χ^2 -test 39,49; df=3; p<0,001), vitamine (χ^2 -test 30,76; df=3; p<0,001) i minerale (χ^2 -test 46,14; df=3; p<0,001). Folnu kiselinu uzimalo je 62,9% majki ispitivane skupine i 66,67% majki usporedne skupine. Nije bilo statistički značajne razlike u navikama i količini pijenja kave, čaja i vode između ispitivane i usporedne skupine (tablica 15).

Tablica 15. Prikaz navika konzumacije alkohola i kave te izloženost duhanskom dimu u roditelja ispitivane i usporedne skupine.

	ISPITIVANA SKUPINA		USPOREDNA SKUPINA		p
	Majke N (%)	Očevi N (%)	Majke N (%)	Očevi N (%)	
Alkohol	4 (14,81)	21 (77,78)	3 (10,00)	22 (73,33)	0,619
4-5 puta tjedno	1 (3,70)	1 (3,70)	0	0	
2-3 puta tjedno	1 (3,70)	6 (22,22)	0	7 (23,33)	
Jednom tjedno	0	7 (25,93)	0	8 (26,67)	
1-3 puta mjesečno	2 (7,41)	7 (25,93)	2 (6,67)	6 (20,00)	
Manje od jednom mjesečno	0	0	1 (3,33)	1 (3,33)	
Pušenje	4 (14,81)	9 (33,33)	3 (10,00)	9 (30,00)	0,599
Izloženost duhanskom dimu od strane ukućana	10 (37,04)	4 (14,81)	9 (30,00)	4 (13,33)	0,535
Izloženost duhanskom dimu na radnom mjestu					0,084
Puno	1 (3,70)	1 (3,70)	0	0	
Malo	4 (14,81)	7 (25,39)	2 (6,67)	4 (13,33)	
Nimalo	22 (81,48)	19 (70,37)	28 (93,33)	26 (86,67)	
Kava	27 (100)	25 (92,59)	27 (90,00)	26 (86,67)	0,115

N – broj roditelja

5.6.4. Izloženost okolišnim čimbenicima

Izloženost okolišnim čimbenicima podijeljena je na izloženost u domu te na izloženost na radnom mjestu. Nije bilo statistički značajne razlike u broju roditelja ispitivane i usporedne skupine koji su u radnom okolišu bili izloženi kemikalijama (otapala, ljepila, adhezivna sredstva, teški metali, formaldehid) (χ^2 -test 0,336; df=1; p=0,562), a niti visokoj razini buke, ekstremnim temperaturama, vibracijama te neionizirajućem zračenju. Ionizirajućem zračenju na radnom mjestu bile su izložene dvije majke ispitivane skupine te dvije iz usporedne skupine, dok su biološkim agensima (rad u zdravstvenoj ustanovi, laboratoriju) bila izložena četiri roditelja ispitivane te šest roditelja usporedne skupine.

Roditelji ispitivane i usporedne skupine izjasnili su se kako im u mjestu stanovanja ne smeta ili tek malo smeta atmosfersko onečišćenje (prosječno 2,2 naprema 2,8 na ljestvici do 10) i buka (prosječno 1,8 naprema 1,7 na ljestvici do 10). Parovi usporedne skupine češće su u domu imali plinsko grijanje u odnosu na ispitivanu skupinu kod kojih je ipak manji dio imao grijane na drva ili električnu energiju (χ^2 -test 13,74; $df=2$; $p=0,001$). Pri upotrebi sredstava za čišćenje parovi ispitivane skupine su statistički značajno češće koristili izbjeljivač (χ^2 -test 5,81; $df=1$; $p=0,016$) te osvježivače zraka (χ^2 -test 6,71; $df=1$; $p=0,009$). Nadalje, roditelji ispitivane skupine češće su koristili insekticidne sprejeve i sredstva protiv komaraca (χ^2 -test 11,1; $df=1$; $p<0,001$) te su češće imali vrt ili terasu (χ^2 -test 11,1; $df=1$; $p<0,001$). Također, dva para ispitivane skupine izjasnila su se kako se njihov dom nalazi blizu poljoprivrednog zemljišta, dok tri para imaju dom blizu tvornice, u odnosu na niti jedan par usporedne skupine.

5.7. Analiza povezanosti biomarkera određenih mikronukleus-testom i demografskih čimbenika, osobitosti medicinske i osobne anamneze, životnih navika te izloženosti okolišnim čimbenicima

Kako bi ispitali da li postoji povezanost između biomarkera određenih MN-testom (učestalost MN-a u binuklearnim i mononuklearnim stanicama, učestalost NPB-a i NBUD-ova, vrijednost NDI-a) i podataka o sociodemografskim obilježjima, osobitostima medicinske i osobne anamneze te životnim navikama i izloženosti okolišnim čimbenicima provedena je multivarijatna regresijska analiza uz primjenu unatražnog postepenog biranja (engl. backward stepwise selection). Pri tome je univarijatnom korelacijskom analizom ispitana povezanost između parametara iz anketnog upitnika i biomarkera određenih MN-testom te je multivarijatna analiza provedena s parametrima koji su pokazali statistički značajnu povezanost.

Bez obzira na razinu statističke značajnosti multivarijatna regresijska analiza je provedena i s parametrima za koje se pretpostavlja da imaju utjecaj na razinu MN-a. Pri tome su u analizu kao nezavisni prediktori uključeni sljedeći parametri: broj spontanih pobačaja (pitanje 1.2.2B), rendgensko snimanje u posljednjih 10 godina (pitanje 1.3.6), konzumacija vitaminskih pripravaka s folnom kiselinom (pitanje 2.1.10), konzumacija alkohola (pitanje 2.2.1), pušenje (pitanje 2.2.3), izloženost duhanskom dimu od strane ukućana (pitanje 2.2.6) te izloženost kemikalijama na radnom mjestu (pitanje 3.1.4A, otapala, boje, adhezivna sredstva). Multivarijatnom regresijskom analizom dobili smo da je učestalost MN-a, NPB-a i NBUD-ova upravo proporcionalno povezana samo s brojem spontanih pobačaja (pitanje 1.2.2B). Učestalost MN-a u mononuklearnim stanicama je bila statistički značajno nezavisno obrnuto proporcionalno povezana s konzumiranjem vitaminskih pripravaka s folnom kiselinom (pitanje 2.1.10, odgovor DA - veći broj MN-a) te upravo proporcionalno povezana s brojem spontanih pobačaja (pitanje 1.2.2B). Za vrijednost NDI-a nije utvrđena statistički značajna povezanost s niti jednim od ispitivanih parametara ($R^2=0,154$; $p=0,012$ za model, tablica 16).

Tablica 16. Rezultati multivarijatne regresijske analize povezanosti biomarkera određenih MN-testom i unaprijed predviđenih nezavisnih varijabli.

Nezavisna varijabla	Biomarkeri određeni MN-testom				
	BCMN $\beta \pm SE, p$	MNMC $\beta \pm SE, p$	NPB $\beta \pm SE, p$	NBUD $\beta \pm SE, p$	NDI $\beta \pm SE, p$
1.2.2B	0,365 ± 0,089 p<0,001*	0,296 ± 0,090 p=0,001*	0,188 ± 0,092 p=0,044*	0,389 ± 0,088 p<001*	0,004 ± 0,096 p=0,970
1.3.6.	-0,090 ± 0,091 p=0,328	0,031 ± 0,031 p=0,738	-0,140 ± 0,095 p=0,142	-0,085 ± 0,090 p=0,349	-0,003 ± 0,098 p=0,975
2.1.10 - folna	-0,095 ± 0,097 p=0,329	-0,235 ± 0,098 p=0,019*	-0,151 ± 0,100 p=0,136	-0,117 ± 0,095 p=0,222	-0,054 ± 0,105 p=0,168
2.2.1.	-0,005 ± 0,105 p=0,962	-0,053 ± 0,106 p=0,618	-0,155 ± 0,109 p=0,157	-0,134 ± 0,103 p=0,196	0,157 ± 0,113 p=0,168
2.2.3.	-0,137 ± 0,105 p=0,196	-0,124 ± 0,107 p=0,247	-0,162 ± 0,109 p=0,140	0,064 ± 0,103 p=0,535	-0,033 ± 0,113 p=0,771
2.2.6.	-0,090 ± 0,099 p=0,368	-0,049 ± 0,101 p=0,632	-0,096 ± 0,103 p=0,353	0,043 ± 0,098 p=0,665	-0,016 ± 0,107 p=0,879
3.1.4A	-0,052 ± 0,096 p=0,589	-0,108 ± 0,097 p=0,267	0,041 ± 0,099 p=0,677	-0,150 ± 0,094 p=0,115	0,087 ± 0,103 p=0,404

1.2.2B – broj spontanih pobačaja, 1.3.6. – rendgensko snimanje u posljednjih 10 godina, 2.1.10. – konzumacija vitaminskih pripravaka s folnom kiselinom, 2.2.1. – konzumacija alkohola, 2.2.3. – pušenje, 2.2.6. – izloženost duhanskom dimu od strane ukućana, 3.1.4A - izloženost kemikalijama na radnom mjestu (otapala, boje, adhezivna sredstva).

Prikazane su vrijednosti korelacijskog koeficijenta (β - beta) uz standardnu grješku (SE).

*p<0,05.

5.7.1. *Analiza povezanosti učestalosti mikronukleusa i parametara dobivenih anketnim upitnikom*

Univarijatna korelacijska analiza je pokazala da postoji statistički značajna povezanost između 33 anketna pitanja i ukupnog broja MN-a te su navedeni parametri uključeni u multivarijatnu regresijsku analizu primjenom unatražnog postepenog protokola. Multivarijatni model dobiven regresijskom analizom je uključivao 12 parametara za koje je ispitana povezanost s ukupnim brojem MN-a kao zavisnom varijablom ($R^2=0,651$, $p<0,001$ za model). U tablici 17 prikazane su vrijednosti β korelacijskog koeficijenta uz standardnu grješku i vrijednosti 95%-tne granice pouzdanosti.

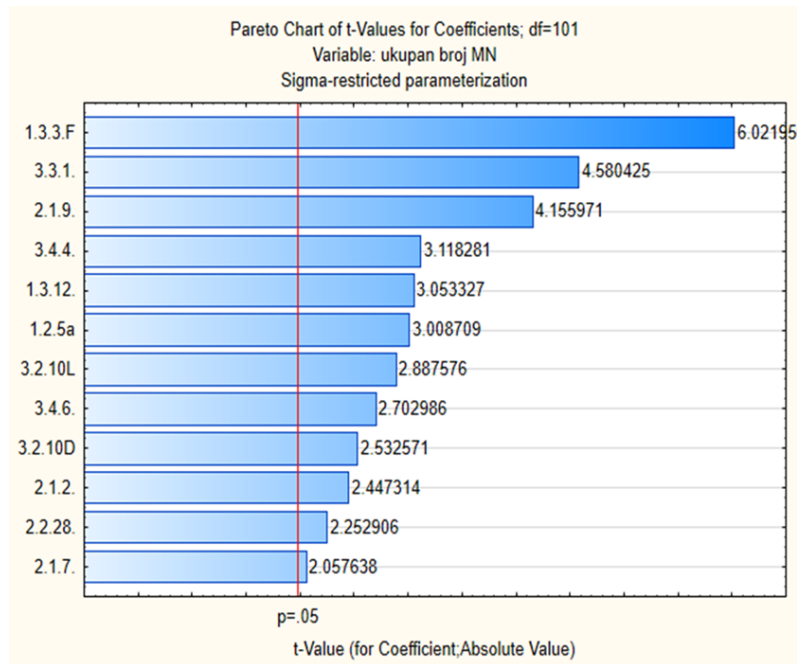
Multivarijatnom regresijskom analizom je utvrđeno da je ukupni broj MN-a statistički značajno nezavisno obrnuto proporcionalno povezan sa napludnošću (pitanje 1.2.5A, odgovor DA na pitanje da li ste teško zatrudnjeli - veći broj MN-a), preboljenom tuberkulozom (pitanje 1.3.3F, odgovor DA - veći broj MN-a), uzimanjem lijekova posljednjih godinu dana (pitanje 1.3.12, odgovor DA - veći broj MN-a), korištenjem odstranjivača mrlja (3.2.10D, odgovor DA - veći broj MN-a), posjedovanjem vrta ili terase sa zelenilom (pitanje 3.3.1, odgovor DA - veći broj MN-a) i pijenjem kave (pitanje 3.4.6, odgovor DA - veći broj MN-a) te upravo proporcionalno povezan s odgovorom - ne proizvode hranu kod kuće (pitanje 2.1.2), brojem obroka bijelog mesa (pitanje 2.1.7), brojem obroka konzervirane hrane (pitanje 2.1.9), nekorištenjem opojnih sredstava (pitanje 2.2.8), nekorištenjem parfimiranih sredstava za čišćenje (3.2.10L) i pijenjem vode iz boce (pitanje 3.4.4). Najveća razina povezanosti uočena je između ukupnog broja MN-a i podatka o preboljenoj tuberkulozi, posjedovanja vrta ili terase sa zelenilom te broja obroka konzervirane hrane (slike 18 i 19).

Tablica 17. Rezultati multivarijantne regresijske analize povezanosti ukupnog broja MN-a i parametara dobivenih anketnim upitnikom.

Anketno pitanje	Broj MN				
	β	SE	-95.00% CL	+95.00% CL	p
1.2.5A	-0,188	0,063	-0,312	-0,064	0,003
1.3.3F	-0,380	0,063	-0,506	-0,255	0,000
1.3.12.	-0,203	0,066	-0,335	-0,071	0,003
2.1.2.	0,214	0,087	0,041	0,387	0,016
2.1.7.	0,131	0,064	0,005	0,257	0,042
2.1.9.	0,257	0,062	0,134	0,379	0,000
2.2.8.	0,151	0,067	0,018	0,284	0,026
3.2.10D	-0,168	0,066	-0,299	-0,036	0,013
3.2.10L	0,183	0,063	0,057	0,308	0,005
3.3.1.	-0,377	0,082	-0,540	-0,214	0,000
3.4.4.	0,209	0,067	0,076	0,342	0,002
3.4.6.	-0,165	0,061	-0,286	-0,044	0,008

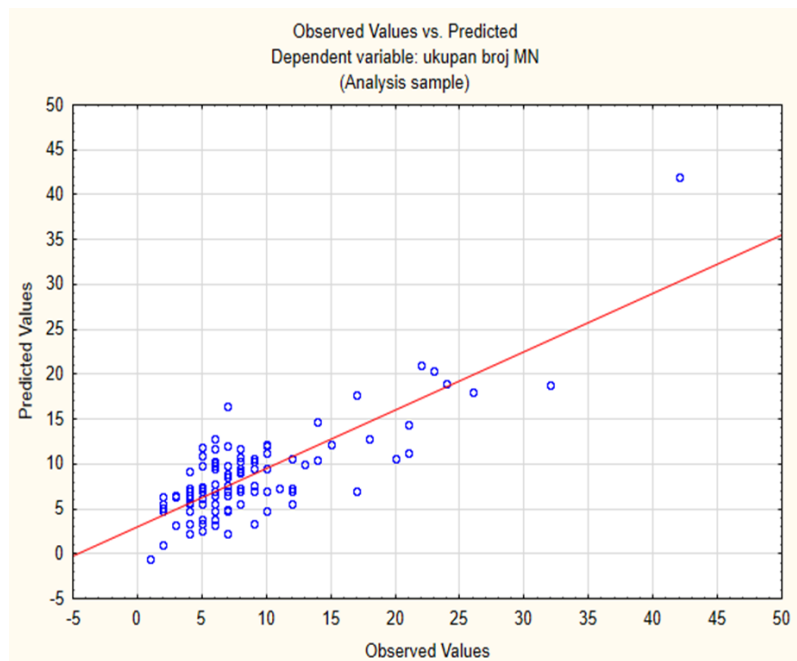
β - korelacijski koeficijent; CL – granica pouzdanosti; SE - standardna grješka.

1.2.5A- neplodnost; 1.3.3F- preboljena tuberkuloza; 1.3.12. - uzimanjem lijekova posljednjih godinu dana; 2.1.2. - proizvodnja hrane kod kuće; 2.1.7. - broj obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno; 2.1.9. - broj obroka hrane iz konzerve konzumiranih tjedno; 2.2.8. - korištenje opojnih sredstava; 3.2.10D - korištenjem odstranjivača mrlja; 3.2.10L - korištenje parfimiranih sredstava za čišćenje; 3.3.1. – posjedovanje vrta ili terase sa zelenilom; 3.4.4. - pije vode iz boce; 3.4.6. - pije kave.



Slika 18. Pareto diagram koji pokazuje razinu povezanosti nezavisnih varijabli s ukupnim brojem MN-a (crvena linija predstavlja $p=0.05$).

1.2.5A- neplodnost; 1.3.3F- preboljena tuberkuloza; 1.3.12. - uzimanjem lijekova posljednjih godinu dana; 2.1.2. - proizvodnja hrane kod kuće; 2.1.7. - broj obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno; 2.1.9. - broj obroka hrane iz konzerve konzumiranih tjedno; 2.2.8. - korištenje opojnih sredstava; 3.2.10D - korištenjem odstranjivača mrlja; 3.2.10L - korištenje parfimiranih sredstava za čišćenje; 3.3.1. – posjedovanje vrta ili terase sa zelenilom; 3.4.4. - pijeње vode iz boce; 3.4.6. - pijeње kave.



Slika 19. Diagram raspršenja između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za ukupan broj MN-a.

5.7.2. Analiza povezanosti učestalosti mikronukleusa u mononuklearnim stanicama i parametara dobivenih anketnim upitnikom

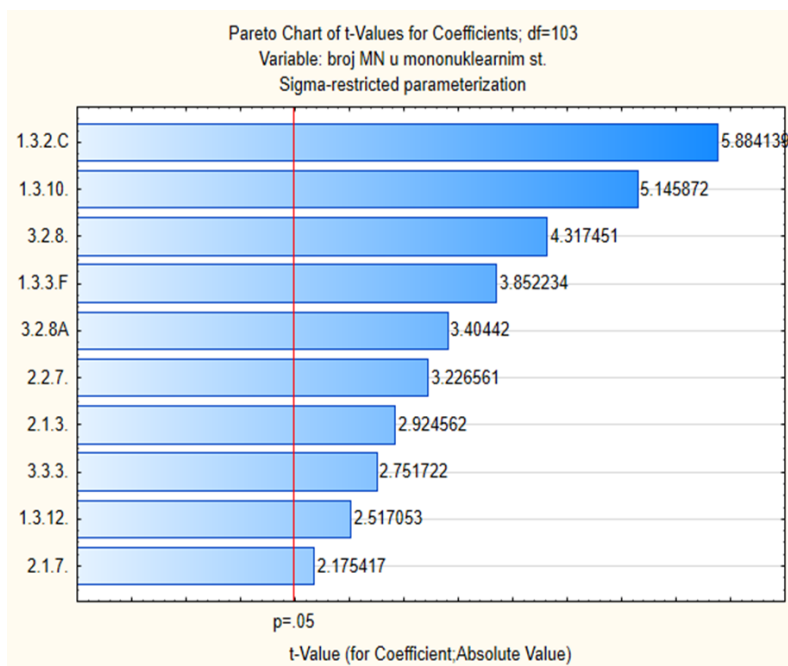
Multivarijantni model dobiven regresijskom analizom uključivao je devet parametara za koje je ispitana povezanost s ukupnim brojem MN-a u mononuklearnim stanicama ($R^2=0,641$; $p<0.001$ za model, tablica 18). Pokazalo se da je broj MN-a u mononuklearnim stanicama statistički značajno nezavisno obrnuto proporcionalno povezan s prisutnošću člana obitelji s cerebralnom paralizom (pitanje 1.3.2C, odgovor DA - veći broj MN-a), preboljenom tuberkulozom (pitanje 1.3.3F, odgovor DA - veći broj MN-a), primanjem transfuzije krvi (pitanje 1.3.10, odgovor DA - veći broj MN-a), uzimanjem lijekova posljednjih godinu dana (pitanje 1.3.12, odgovor DA - veći broj MN-a), izloženosti pušenju na radnom mjestu (pitanje 2.2.7, odgovor malo - veći broj MN-a), korištenjem plastičnih posuda prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici (pitanje 3.2.8, odgovor DA - veći broj MN-a) i stanovanju u blizini staklenika ili poljoprivrednog zemljišta (pitanje 3.3.3, odgovor DA - veći broj MN-a) te upravo proporcionalno povezano s nekonzumiranjem organski uzgojene hrane (pitanje 2.1.3) i brojem obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno (pitanje 2.1.7). Razina povezanosti nezavisnih varijabli s brojem MN-a u mononuklearnim stanicama prikazana je na slici 20, dok slika 21 prikazuje odnos između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za broj MN-a u mononuklearnim stanicama.

Tablica 18. Rezultati multivarijatne regresijske analize povezanosti ukupnog broja MN-a u mononuklearnim stanicama i parametara dobivenih anketnim upitnikom.

Anketno pitanje	MNMC				
	β	SE	-95.00% CL	+95.00% CL	p
1.3.2C	-0,368	0,063	-0,492	-0,244	0,000
1.3.3F	-0,278	0,072	-0,421	-0,135	0,000
1.3.10.	-0,306	0,060	-0,425	-0,188	0,000
1.3.12.	-0,168	0,067	-0,301	-0,036	0,013
2.1.3.	0,178	0,061	0,057	0,299	0,004
2.1.7.	0,138	0,063	0,012	0,263	0,032
2.2.7.	-0,198	0,061	-0,320	-0,076	0,002
3.2.8.	-0,515	0,119	-0,752	-0,279	0,000
3.3.3.	-0,203	0,074	-0,349	-0,057	0,007

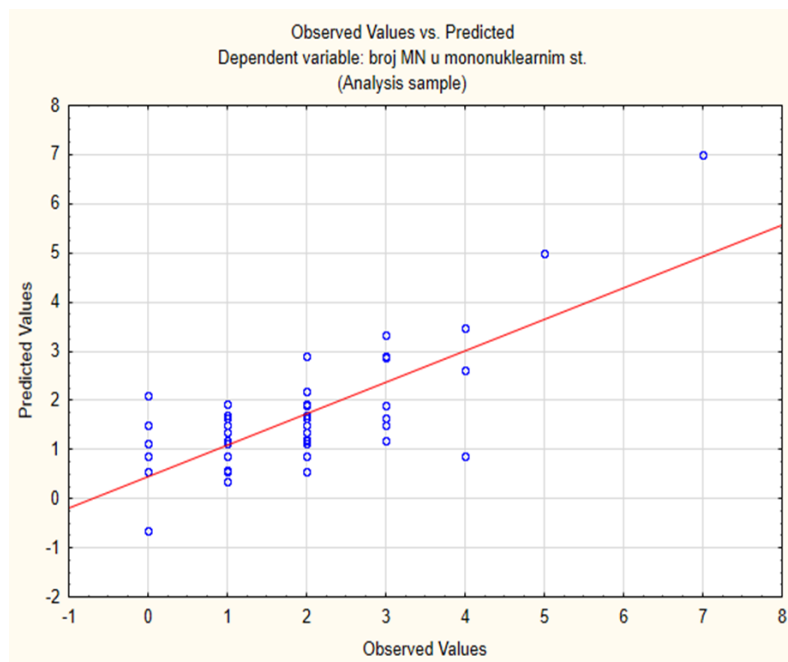
β - korelacijski koeficijent; CL – granica pouzdanosti; MNMC – broj MN-a u mononuklearnim stanicama; SE - standardna grješka.

1.3.2C – član obitelji s cerebralnom paralizom; 1.3.3F – preboljena tuberkuloza; 1.3.10. – primanje transfuzije krvi; 1.3.12. – uzimanje lijekova u posljednjih godinu dana; 2.1.3. – konzumacija organski uzgojene hrane; 2.1.7. – broj obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno; 2.2.7. – izloženost pušenju na radnom mjestu; 3.2.8. – korištenje plastičnih posuda prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici; 3.3.3. – smještaj doma u blizini staklenika ili poljoprivrednog zemljišta.



Slika 20. Pareto diagram koji pokazuje razinu povezanosti nezavisnih varijabli s brojem MN-a u mononuklearnim stanicama (crvena linija predstavlja $p=0,05$).

1.3.2C – član obitelji s cerebralnom paralizom; 1.3.3F – preboljena tuberkuloza; 1.3.10. – primanje transfuzije krvi; 1.3.12. – uzimanje lijekova u posljednjih godinu dana; 2.1.3. – konzumacija organski uzgojene hrane; 2.1.7. – broj obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno; 2.2.7. – izloženost pušenju na radnom mjestu; 3.2.8. – korištenje plastičnih posuda prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici; 3.3.3. – smještaj doma u blizini staklenika ili poljoprivrednog zemljišta.



Slika 21. Diagram raspršenja između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za broj MN-a u mononuklearnim stanicama

5.7.3. *Analiza povezanosti učestalosti nukleoplazmatskih mostova i parametara dobivenih anketnim upitnikom*

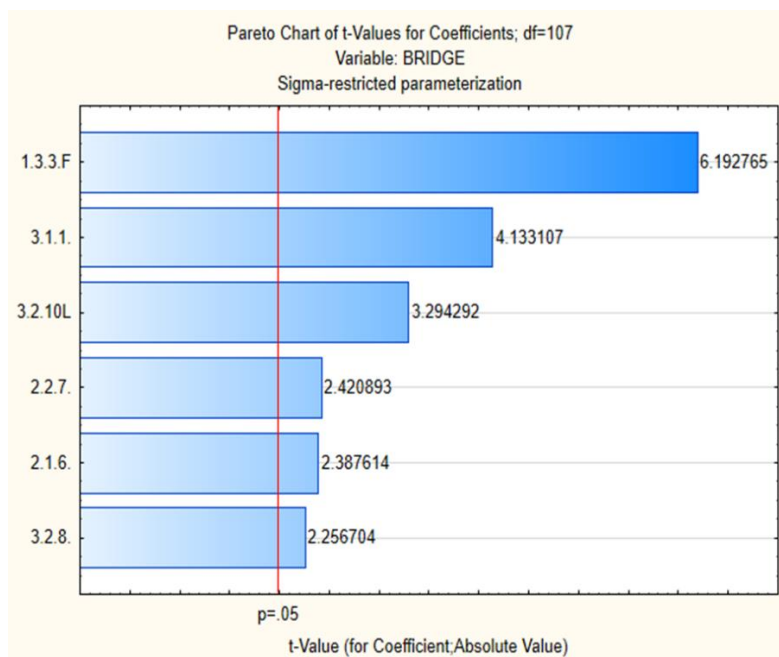
Multivarijantnom regresijskom analizom dobiveno je da je učestalost NPB-a statistički značajno nezavisno obrnuto proporcionalno povezana s preboljenom tuberkulozom (pitanje 1.3.3.F, odgovor DA - veći broj NPB-a), izloženosti pušenju na radnom mjestu (pitanje 2.2.7, odgovor malo - veći broj NPB-a) i korištenjem plastičnih posuda prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici (pitanje 3.2.8, odgovor DA - veći broj NPB-a) te upravo proporcionalno povezano s brojem obroka crvenog mesa konzumiranih tjedno (pitanje 2.1.6), nezaposlenošću (pitanje 3.1.1) i nekorištenjem parfumiranih sredstava za čišćenje (pitanje 3.2.10L) ($R^2=0,466$; $p<0,001$ za model, tablica 19). Razina povezanosti nezavisnih varijabli s brojem NPB-a prikazana je na slici 22, dok slika 23 prikazuje odnos između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za učestalost NPB-a.

Tablica 19. Rezultati multivarijantne regresijske analize povezanosti učestalosti NPB-a i parametara dobivenih anketnim upitnikom.

Anketno pitanje	NPB				
	β	SE	-95.00% CL	+95.00% CL	p
1.3.3F	-0,458	0,074	-0,605	-0,312	0,000
2.1.6.	0,174	0,073	0,030	0,318	0,019
2.2.7.	-0,175	0,072	-0,319	-0,032	0,017
3.1.1.	0,300	0,073	0,156	0,444	0,000
3.2.8.	-0,169	0,075	-0,317	-0,021	0,026
3.2.10L	0,236	0,072	0,094	0,379	0,001

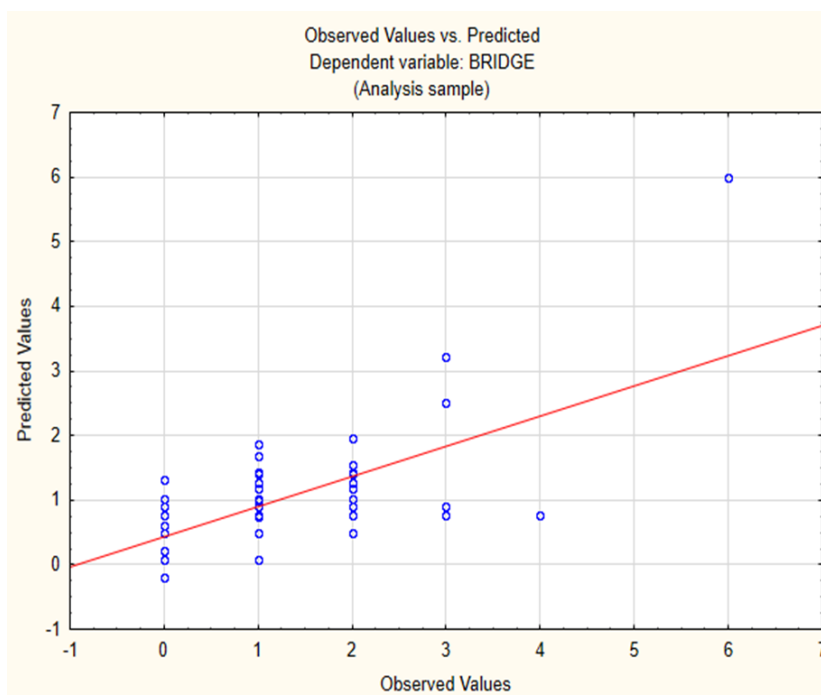
β - korelacijski koeficijent; CL – granica pouzdanosti; SE - standardna grješka.

1.3.3F – preboljena tuberkuloza; 2.1.6. – broj obroka crvenog mesa konzumiranih tjedno; 2.2.7. – izloženost pušenju na radnom mjestu; 3.1.1. – zaposlenost; 3.2.8. – korištenje plastičnih posuda prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici; 3.2.10L – korištenje parfumiranih sredstava za čišćenje.



Slika 22. Pareto diagram koji pokazuje razinu povezanosti nezavisnih varijabli s učestalošću NPB-a (crvena linija predstavlja $p=0,05$).

1.3.3F – preboljena tuberkuloza; 2.1.6. – broj obroka crvenog mesa konzumiranih tjedno; 2.2.7. – izloženost pušenju na radnom mjestu; 3.1.1. – zaposlenost; 3.2.8. – korištenje plastičnih posuda prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici; 3.2.10L – korištenje parfumiranih sredstava za čišćenje.



Slika 23. Diagram raspršenja između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za učestalost NPB-a.

5.7.4. *Analiza povezanosti učestalosti nuklearnih pupova i parametara dobivenih anketnim upitnikom*

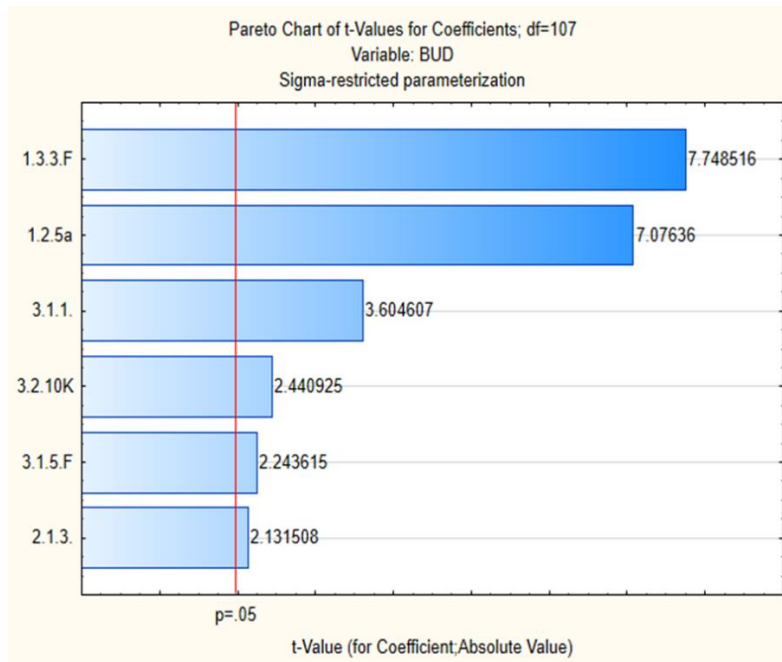
Multivarijantnom regresijskom analizom je utvrđeno da je učestalost NBUD-ova statistički značajno nezavisno obrnuto proporcionalno povezana s problemima s neplodnošću (pitanje 1.2.5A, odgovor DA na pitanje da li ste teško zatrudnjeli - veći broj NBUD-ova), preboljenom tuberkulozom (pitanje 1.3.3.F, odgovor DA - veći broj NBUD-ova) i korištenjem tekućine za peglanje (pitanje 3.2.10K – odgovor DA - veći broj NBUD-ova) te upravo proporcionalno povezana s nekonzumiranjem organski uzgojene hrane (pitanje 2.1.3), s nezaposlenošću (pitanje 3.1.1) i neizloženošću biološkim zaraznim čimbenicima na radnom mjestu (pitanje 3.1.5F) ($R^2=0.556$, $p<0.001$ za model, tablica 20). Razina povezanosti nezavisnih varijabli s brojem NBUD-ova prikazana je na slici 22, dok slika 23 prikazuje odnos između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za učestalost NBUD-ova.

Tablica 20. Rezultati multivarijantne regresijske analize povezanosti učestalosti NBUD-ova i parametara dobivenih anketnim upitnikom.

Anketno pitanje	NBUD				
	β	SE	-95.00% CL	+95.00% CL	p
1.2.5A	-0,458	0,065	-0,587	-0,330	0,000
1.3.3F	-0,500	0,065	-0,628	-0,372	0,000
2.1.3.	0,138	0,065	0,010	0,267	0,035
3.1.1.	0,233	0,065	0,105	0,361	0,000
3.1.5F	0,145	0,065	0,017	0,274	0,027
3.2.10K	-0,158	0,065	-0,287	-0,030	0,016

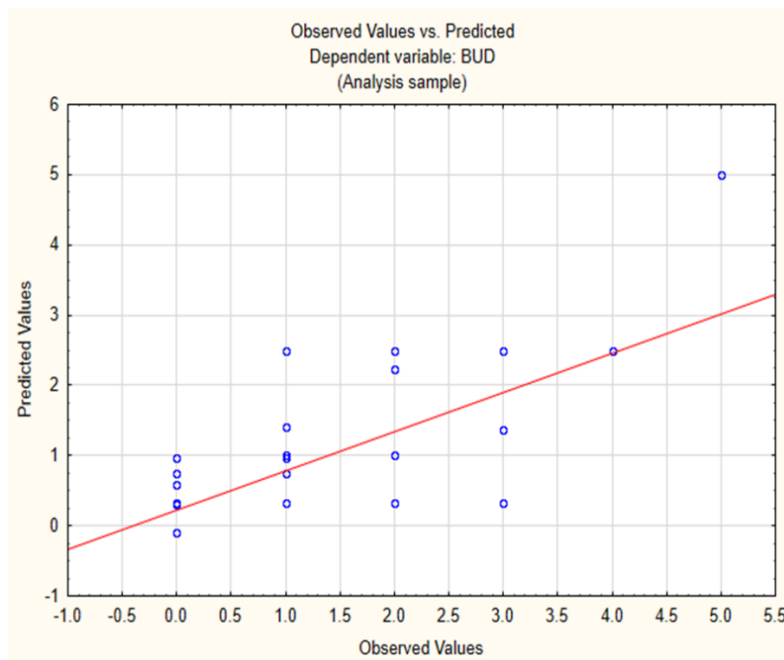
β - korelacijski koeficijent; CL – granica pouzdanosti; SE - standardna grješka.

1.2.5A – neplodnost; 1.3.3F – preboljena tuberkuloza; 2.1.3. – konzumacija organski uzgojene hrane; 3.1.1. – zaposlenost; 3.1.5F – izloženost biološkim zaraznim čimbenicima na radnom mjestu; 3.2.10K – korištenje tekućine za peglanje.



Slika 24. Pareto diagram koji pokazuje razinu povezanosti nezavisnih varijabli s učestalošću NBUD-ova (crvena linija predstavlja $p=0,05$).

1.2.5A – sterilitet; 1.3.3F – preboljena tuberkuloza; 2.1.3. – konzumacija organski uzgojene hrane; 3.1.1. – zaposlenost; 3.1.5F – izloženost biološkim zaraznim čimbenicima na radnom mjestu; 3.2.10K – korištenje tekućine za peglanje.



Slika 25. Diagram raspršenja između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za učestalost NBUD-ova.

5.7.5. *Analiza povezanosti indeksa diobe jezgara i parametara dobivenih anketnim upitnikom*

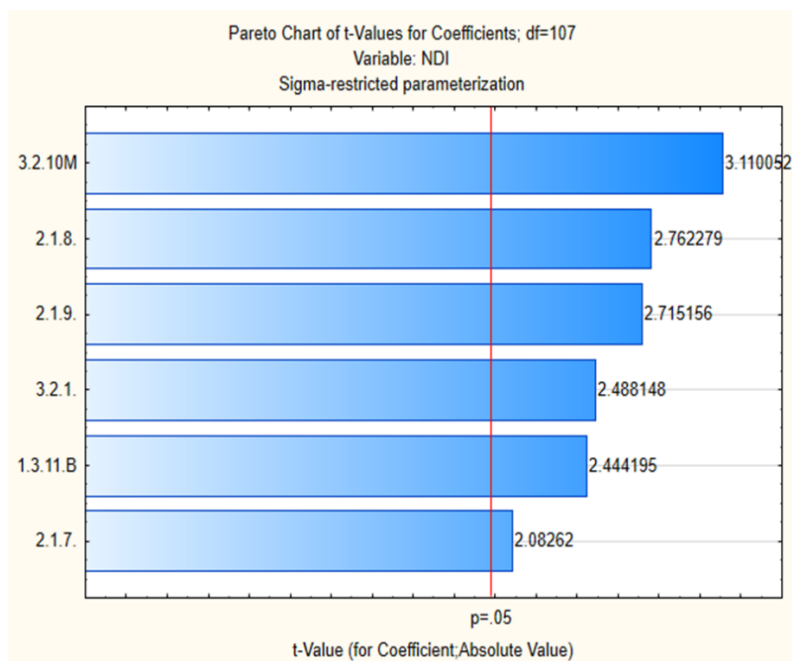
Multivarijatnom regresijskom analizom je utvrđeno da je vrijednost NDI-a statistički značajno nezavisno obrnuto proporcionalno povezana s pojavom atopijskog dermatitisa u obitelji (pitanje 1.3.11B, odgovor DA - veći NDI), brojem obroka konzervirane hrane konzumiranih tjedno (pitanje 2.1.9), korištenjem univerzalnih sredstava za čišćenje (pitanje 3.2.10M, odgovor DA - veći NDI) te upravo proporcionalno povezana s brojem obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno (pitanje 2.1.7), brojem obroka ribljih proizvoda konzumiranih tjedno (pitanje 2.1.8) i osobnom procjenom atmosferskog onečišćenja u mjestu stanovanja (pitanje 3.2.1) ($R^2=0,288$; $p<0.001$ za model, tablica 21). Razina povezanosti nezavisnih varijabli s vrijednostima NDI-a prikazana je na slici 26, dok slika 27 prikazuje odnos između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za vrijednost NDI-a.

Tablica 21. Rezultati multivarijatne regresijske analize povezanosti učestalosti indeksa diobe jezgara i parametara dobivenih anketnim upitnikom.

Anketno pitanje	NDI				
	β	SE	-95.00% CL	+95.00% CL	p
1.3.11B	-0,200	0,082	-0,362	-0,038	0,016
2.1.7.	0,179	0,086	0,009	0,348	0,040
2.1.8.	0,242	0,088	0,068	0,416	0,007
2.1.9.	-0,229	0,084	-0,396	-0,062	0,008
3.2.1.	0,206	0,083	0,042	0,370	0,014
3.2.10M	-0,256	0,082	-0,419	-0,093	0,002

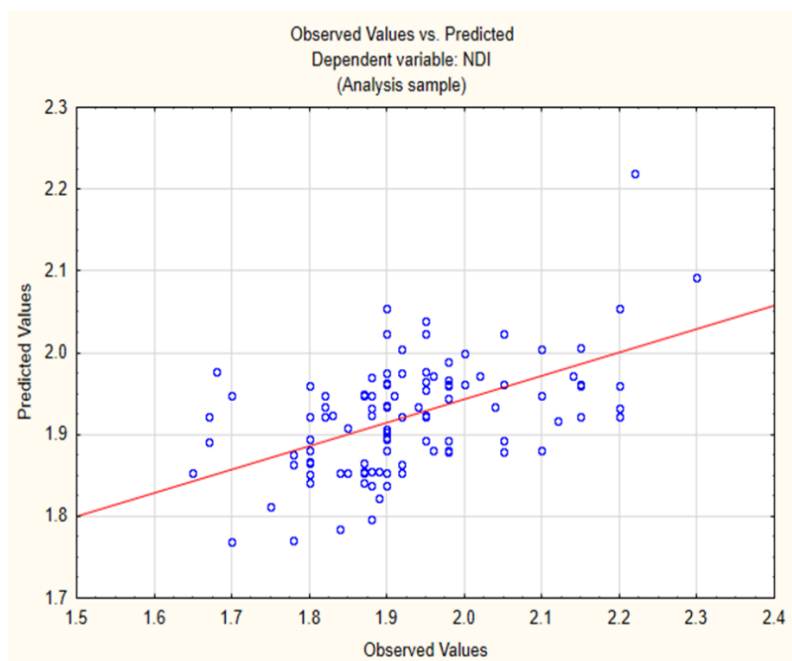
β - korelacijski koeficijent; CL – granica pouzdanosti; SE - standardna grješka.

1.3.11B – ispitanik ili član obitelji boluje od atopijskog dermatitisa; 2.1.7. – broj obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno; 2.1.8. – broj obroka ribljih proizvoda konzumiranih tjedno; 2.1.9. – broj obroka konzervirane hrane konzumiranih tjedno; 3.2.1. – osobna procjena roditelja vezano uz atmosfersko onečišćenje u mjestu njihova stanovanja; 3.2.10M – korištenje univerzalnih sredstava za čišćenje.



Slika 26. Pareto diagram koji pokazuje razinu povezanosti nezavisnih varijabli s vrijednosti NDI-a (crvena linija predstavlja $p=0,05$).

1.3.11B – ispitanik ili član obitelji boluje od atopijskog dermatitisa; 2.1.7. – broj obroka bijelog mesa konzumiranih tjedno; 2.1.8. – broj obroka ribljih proizvoda konzumiranih tjedno; 2.1.9. – broj obroka konzervirane hrane konzumiranih tjedno; 3.2.1. – procjena atmosferskog onečišćenja u mjestu stanovanja; 3.2.10M – korištenje univerzalnih sredstava za čišćenje.



Slika 27. Diagram raspršenja između izmjerenih i vrijednosti izračunatih korištenjem prediktivnih varijabli za NDI.

6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem ispitali smo značaj moguće primjene mikronukleus-testa i metode FISH u procjeni reproduktivnog rizika ponavljanja trisomije 21 ali i nastajanja drugih numeričkih kromosomskih abnormalnosti u mladim parova s obiteljskom anamnezom trudnoće sa slobodnim oblikom DS-a. Iako je trisomija 21 najčešći kromosomski poremećaj u humanoj populaciji još uvijek se malo zna o mehanizmima koji dovode do njenog nastanka. Najčešće istraživani i do sada jedini dokazani čimbenik rizika jest starija dob majke u trenutku začeća. Međutim, otprilike 40% trudnoća sa slobodnim oblikom DS-a otkrije se u žena mlađih od 35 godina (2). Do danas nisu razjašnjeni čimbenici koji utječu na pojavu trisomije 21 u mladim parova. Unatoč velikom broju istraživanja usmjerenih ka određivanju etiologije trisomije 21, većina ih se provodi na populaciji majki neovisno o životnoj dobi, čime je malo dostupnih literaturnih podataka o uzrocima pojavnosti DS-a kod mladih žena. Nadalje, otprilike 4-10% slučajeva trisomije 21 je očevog podrijetla. Utjecaj čimbenika očevog podrijetla na nastanak trisomije 21 znatno se rjeđe proučava, te do danas nisu jednoznačni rezultati istraživanja o utjecaju očeve dobi, ali i mogućih drugih čimbenika (7,114). Stoga smo u naše istraživanje odlučili uključiti pored majki koje su imale trudnoću s DS-om i očeve. Nedovoljno poznavanje etiologije DS-a predstavlja veliki problem u procjeni rizika pojavnosti DS-a u mladim parova. Naime, prenatalna dijagnostika DS-a temelji se na citogenetskoj analizi stanica ploda dobivenih invazivnim metodama, dok se procjena rizika rađanja kromosomski bolesnog djeteta provodi primjenom neke od neinvazivnih metoda. Današnji postupnici procjene rizika zasnivaju se na individualnom izračunu rizika za svaku trudnicu ponaosob. Prisustvo trisomije 21 u prethodnoj trudnoći jedan je od čimbenika koji se uzima u obzir pri izračunu rizika pojavnosti ove, ali i drugih kromosomopatija u idućim trudnoćama. Prema novijim istraživanjima smatra se da je rizik ponavljanja trisomije 21 u idućim trudnoćama 2,4 puta veći u odnosu na rizik dobi, a u žena koje su trudnoću s DS-om imale u dobi mlađoj od 30 godina čak osam puta veći (56). Tako visok rizik ponavljanja kromosomopatije može negativno utjecati na odluku roditelja o ostvarivanju idućih trudnoća. Primjenom dodatnih biomarkera u procjeni rizika pojavnosti kromosomski abnormalnog ploda u idućim trudnoćama, parovima bi se mogla olakšati odluka o planiranju roditeljstva.

Novijim istraživanjima citogenetičkih osobitosti perifernih krvi parova koji su u mlađoj dobi imali trudnoću ili dijete s DS-om uočava se veća učestalost pogrešnog razdvajanja kromosoma 21 te se pretpostavlja kako ti parovi imaju veću sklonost

nerazdvajanju kromosoma u somatskim stanicama, ali i za vrijeme gametogeneze. Kao idealna, odnosno brza, pouzdana i automatizirana metoda za proučavanje kromosomske nestabilnosti pokazao se MN-test na limfocitima periferne krvi. Stoga smo u našem istraživanju primjenom MN-testa i metode FISH ispitali postoji li povećana sklonost nerazdvajanju kromosoma kod 30 mladih parova koji u svojoj anamnezi imaju trudnoću ili dijete sa slobodnim oblikom DS-a.

Iz daljnjeg istraživanja isključena su tri para ispitivane skupine te je od 27 parova kod njih 26 bila dijagnosticirana trudnoća s trisomijom 21, dok je samo jedan par imao dijete s DS-om. Ova razlika posljedica je činjenice da su parovi uključeni u istraživanje birani među roditeljima upućenim na prenatalnu dijagnostiku na Kliniku za ginekologiju i porodništvo uslijed prethodno dijagnosticirane trudnoće s trisomijom 21 ili povećanog rizika rađanja kromosomski bolesnog djeteta utvrđenim biokemijskim i/ ili ultrazvučnim probirom u prvom ili drugom tromjesečju trudnoće, dok je većina majki koje su u periodu istraživanja u našoj ustanovi rodile dijete s DS-om bila starije životne dobi. Citogenetskom analizom fetalnih stanica i uzorka periferne krvi djeteta s DS-om muški spol je nađen u 17, a ženski u 10 analiziranih uzoraka. Omjer muškog naprema ženskom spolu od 1,7 znatno je veći u usporedbi s omjerom 1,2 koji se nalazi u populaciji osoba s DS-om. Međutim, istraživanjem koje je uključivalo 1329 djece s DS-om Kovaleva i suradnici (210) nalaze omjer od 1,61 u korist muškog spola u skupini mladih majki koje su rodile dijete sa slobodnim oblikom DS-a, u usporedbi s omjerom od 1,24 nađenom u cjelokupnom uzorku neovisno o dobi majke i tipu kromosopatije. Autori pretpostavljaju da bi veći udio muškog spola kod mladih majki mogao biti posljedica većeg omjera trisomije 21 očevog podrijetla. Ova pretpostavka se temelji na činjenici da su prethodna istraživanja pokazala veći udio muškog spola u slučajevima trisomije 21 nastale uslijed nerazdvajanja kromosoma tijekom očeve spermatogeneze (211). No, nisu sasvim razjašnjeni uzroci povezanosti nepravilne segregacije kromosoma 21 s kromosomom Y (212). Nadalje, kao jedan od uzroka različitog omjera spola ne može se isključiti niti mogućnost manje vijabilnosti ženske populacije plodova s trisomijom 21.

Prilikom provedbe MN-testa odredili smo učestalost MN-a na 1000 binuklearnih stanica, raspodjelu MN-a u binuklearnim stanicama, učestalost NPB-a, NBUD-ova te učestalost MN-a u mononuklearnim stanicama. Analizom ukupnog broja MN-a utvrdili smo statistički značajno višu učestalost MN-a u roditelja ispitivane skupine u odnosu na usporednu. Dobiveni rezultati podudaraju se s istraživanjem Abdel Hady-a i suradnika (139)

koji su u majki djece s DS-om mlađih od 30 godina uočili veću učestalost nerazdvajanja kromosoma 21 primjenom MN-testa i metode FISH. Migliore i suradnici (13) također uočavaju značajno veću učestalost MN-a u majki koje su u mlađoj dobi imale trudnoću s DS-om, dok FISH-analizom utvrđuju veći postotak nerazdvajanja kromosoma 21 u binuklearnim stanicama, u odnosu na usporednu skupinu. Nadalje, autori uočavaju pozitivan porast broja MN-a sa životnom dobi, iako se trend rasta broja MN-a uglavnom odnosio na usporednu skupinu, odnosno u ispitivanoj skupini je zabilježen manji utjecaj dobi na broj MN-a. Uspoređujući s našim rezultatima nismo uočili svezu između dobi ispitanika i učestalosti MN-a, što je bilo i očekivano s obzirom da su roditelji u našem istraživanju sudjelovali u vremenskom razdoblju od najviše godinu dana od dijagnosticirane trudnoće s DS-om, dakle u dobi manjoj od 36 godina (jedan otac je imao 38 godina). Prosječna dob majki u istraživanju Migliorea i suradnika (13) iznosila je 48 godina, što bismo istaknuli kao nedostatak ovog istraživanja.

Usporedbom vrijednosti MN-a unutar podskupina majki i očeva također smo utvrdili statistički značajno višu učestalost MN-a kod majki ispitanika u odnosu na usporednu skupinu. Razlika u učestalosti MN-a između očeva ispitanika i usporedne skupine nije bila statistički značajna nakon analize provedene Kruskal-Wallis-testom uz post-hoc višestruku dvostranu usporedbu. Ipak, i u očeva ispitanika skupine uočava se veća učestalost MN-a u odnosu na usporednu skupinu (9,07 naprema 5,90). Razlika u rezultatima koje smo uočili između podskupine majki i očeva dijelom se može objasniti činjenicom da je trisomija 21 u oko 90-95% slučajeva majčinog, a tek u 4-10% slučajeva očevog podrijetla. Uzroci znatno većeg udijela trisomije 21 majčinog podrijetla još uvijek nisu sasvim razjašnjeni, no jednim od glavnih uzroka smatra se razlika u mehanizmima i vremenskom periodu sazrijevanja muških i ženskih spolnih stanica. Za razliku od spermatogeneze koja započinje u pubertetu te se kontinuirano odvija bez perioda odgode, sazrijevanje oocita započinje u fetalnom razdoblju i traje sve do trenutka oplodnje. Dakle, višegodišnja izloženost vanjskim čimbenicima, ali i fiziološkim promjenama dovodi do veće učestalosti pogrešnog razdvajanja kromosoma kod majki (60). Istraživanje koje su proveli Hultén i suradnici (78,213) na gonadama pobačenih plodova utvrdili su veći udio aneuploidnih stanica u jajnicima ženskih plodova u odnosu na testise muških plodova. Autori pretpostavljaju da su ženske spolne stanice osjetljivije na moguće čimbenike sklonosti nerazdvajanju kromosoma. Nadalje, važno je istaknuti kako je do sada objavljeno samo jedno istraživanje vezano uz citogenetičke osobitosti perifernih krvi mladih roditelja djece s DS-om koje je uključivalo i majke i očeve. Autori su također uočili

značajno višu razinu MN-a u majki i u očeva. S obzirom da se učestalost MN-a smatra biomarkerom strukturnih i brojčanih promjena kromosoma, autori postavljaju hipotezu kako uz već više puta pokazanu sklonost nerazdvajanju kromosoma u majki, i očevi djece s DS-om imaju povišenu razinu kromosomske nestabilnosti (14). U prilog ovoj pretpostavci idu i istraživanja provedena kod majki i očeva koji u anamnezi imaju veći broj opetovanih pobačaja (134), veći broj kromosomski abnormalnih plodova (135), te roditelja djece s trisomijom 13 ili 18 (136,137).

Htjeli bismo istaknuti kako u do sada objavljenim istraživanjima citogenetičkih osobitosti perifernih krvi roditelja djece s DS-om, osim učestalosti MN-a nisu iznesene vrijednosti drugih biomarkera koji se mogu analizirati prilikom provođenja MN-testa. Tek Caria i suradnici (12) u istraživanju učestalosti MN-a induciranih mutagenima u djece s DS-om i njihovih roditelja iznose podatke o učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama, pri čemu ne uočavaju statističku značajnu razliku između dvije grupe ispitanika. U našem istraživanju uočili smo veći broj MN-a u mononuklearnim stanicama kod roditelja ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu, iako razlika nije bila statistički značajna. Spearmanovom univarijantnom korelacijskom analizom uočena je pozitivna korelacija između ukupnog broja MN-a i MN-a u mononuklearnim stanicama. Analizom učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama dobivaju se podatci o stupnju kromosomskih oštećenja i brojčanih kromosomskih promjena nakupljenih tijekom godina u matičnim stanicama i cirkulirajućim limfocitima, odnosno određuju se samo promjene nastale *in vivo*, prije kultiviranja stanica. Valja napomenuti kako mononuklearne stanice prilikom kultiviranja uz dodatak citohalazina B mogu predstavljati stanice koje se nisu uspjele podijeliti tijekom kultiviranja; stanice u kojima je došlo do replikacije DNA, ali ne i diobe jezgre; ili su u ranom stadiju apoptoze ili nekroze. Pretpostavlja se da MN-i u mononuklearnim stanicama nastaju kao posljedica kromatidinih lomova ili oštećenja DNA koja se nakupljaju tijekom godina. Dakle smatra se da MN-i u mononuklearnim stanicama imaju drugačije podrijetlo od MN-a u binuklearnim stanicama, ali daju važne komplementarne podatke u procjeni genomske nestabilnosti nakupljene tijekom godina (145).

Usporedbom učestalosti NPB-a između ispitivane i usporedne skupine, u roditelja ispitivane skupine smo uočili veću srednju vrijednost broja NPB-a na 1000 stanica (0,89 naprema 0,73), iako razlika nije bila statistički značajna. Također, postojala je pozitivna sveza između učestalosti MN-a i NPB-a ($\rho=0,54$; $p<0,001$). Prisutstvo NPB-a ukazuje na postojanje strukturnih kromosomskih razmještanja nastalih uslijed nemogućnosti razdvajanja

dicentričnih kromosoma u stanice kćeri. Dicentrici nastaju nakon pogrešnog popravka lomova DNA, uslijed nepravilnog razdvajanja sestrinskih kromatida u anafazi ili nakon fuzije telomernih krajeva dvaju kromosoma. Stoga se NPB-ovi smatraju biomarkerom koji upućuje na postojanje pogrješaka u popravcima DNA i/ili fuzije telomera (150). Uočava se i povišena razina NPB-a u stanicama s mutacijom *BLM*, prisutnom u osoba s Bloomovim sindromom i Fanconijevom anemijom (214). Nukleoplazmatski mostovi mogu nastati i uslijed poremećaja kromatina i proteina kohezinskog kompleksa, što dovodi do nerazdvajanja sestrinskih kromatida u anafazi (215). Istraživanjem poremećaja funkcije telomera kod karcinoma debelog crijeva na mišjim modelima i ljudskim stanicama, Rudolph i suradnici (216) uočavaju vezu između skraćanja telomera i pojave anafaznih mostova. Stoga autori iznose kako učestalost NPB-a može poslužiti i kao biomarker značajnog skraćanja telomera.

Srednja vrijednost NDI-a nije se statistički značajno razlikovala između ispitivane i usporedne skupine, međutim nešto niže vrijednosti uočili smo u roditelja ispitivane skupine. Nadalje, korelacijskom analizom uočili smo statistički značajnu negativnu povezanost između vrijednosti NDI-a i ukupnog broja MN-a. Indeks diobe jezgara služi kao pokazatelj odgovora na stimulaciju diobe limfocita mitogenima te se pretpostavlja da aneuploidne stanice imaju smanjenu sposobnost diobe. Tako se u starijih osoba s DS-om uočava veći postotak stanica s disomijom 21 (45). Nadalje, NDI se smatra i pokazateljem imunološkog stanja organizma, s obzirom da inicijacija diobe limfocita ovisi o više intrinzičnih faktora kao što je na primjer razina interleukina (217). Dakle, naši rezultati upućuju kako bi u limfocitima perifernih krvi roditelja djece s trisomijom 21 mogao postojati slabiji odgovor na stimulaciju fitohemaglutininom. U prilog ovoj pretpostavci idu i istraživanja kojima se poremećaji proliferacije limfocita uočavaju i u osoba s DS-om. Tako Karttunen i suradnici (218) u osoba s DS-om uočavaju slabiji odgovor limfocita perifernih krvi na stimulaciju fitohemaglutininom. Ipak, u uvjetima *in vitro* nalaze normalne vrijednosti interleukina 2 (IL-2), citokina odgovornog za proliferaciju i diferencijaciju limfocita T. Autori sugeriraju kako bi smanjen odgovor na stimulaciju mitogenima unatoč normalnim vrijednostima IL-2 mogao biti posljedica promijenjene funkcije interleukinskih receptora, za koju se na temelju prethodnih istraživanja pokazalo da opada sa starenjem. U prilog ovom istraživanju idu i rezultati skupine autora koja u djece s DS-om nalaze normalne vrijednosti serumskog IL-2 (219). Suprotno, Stabile i suradnici (220) u kulturi limfocita perifernih krvi djece s DS-om nalaze sniženu razinu IL-2, ali normalne vrijednosti IL-4 te interferona γ (IFN- γ).

Kako bismo utvrdili sadržaj MN-a proveli smo FISH-analizu s pancentromernom probom koja omogućuje utvrđivanje sklonosti nerazdvajanju svih kromosoma te probama specifičnim za kromosom 21 kojima se zasebno ispituje segregacija kromosoma 21. FISH-analizom uz primjenu pancentromerne probe u ispitivanoj skupini smo našli veći postotak MN-a pozitivnih za centromeru (57,1%), u odnosu na 51% MN-a kod roditelja usporedne skupine, što upućuje na veću učestalost nerazdvajanja kromosoma. Prema rezultatima više istraživanja smatra se da između 30 i 70% MN-a u osoba zdrave populacije sadrži cijele kromosome, a udio ovisi o dobi i spolu ispitanika (148,173). U našem istraživanju nije uočena statistički značajna razlika u postotku MN-a pozitivnih za centromeru među podskupinama majki i očeva. Ipak nešto veći postotak MN-a koji sadrže cijele kromosome našli smo u majki usporedne skupine u odnosu na očeve usporedne skupine, što se objašnjava većom učestalošću nerazdvajanja kromosoma X (148). Primjenom centromerne probe 13/21 i mjesno specifične probe LSI 21q22 u ispitivanoj skupini našli smo statistički značajno više MN-a, što upućuje na povećanu sklonost nerazdvajanju kromosoma 21. Viši postotak MN-a koji sadrže kromosom 21 uočili smo u majki ispitivane skupine u odnosu na očeve. Ovi rezultati idu u prilog pretpostavci da je dob majke značajan čimbenik rizika nastajanja ploda sa slobodnim oblikom DS-a. Iako nema statističku značajnost, broj MN-a koji sadrže kromosom 13 ili pericentromerno područje kromosoma 21 nalazi se u većem postotku u roditelja ispitivane skupine. Ovaj rezultat može upućivati na moguću predispoziciju nerazdvajanju ne samo kromosoma 21 već i drugih autosoma i spolnih kromosoma. Osim analize sadržaja MN-a, probama za centromeru 13/21 i LSI 21q22 smo proveli analizu nerazdvajanja kromosoma 21 u binuklearnih stanicama. U roditelja ispitivane skupine uočili smo značajno veći postotak stanica s nerazdvajanjem kromosoma 21, u odnosu na usporednu skupinu. Dakle, rezultati FISH-analize upućuju kako parovi ispitivane skupine imaju općenito povećanu sklonost nerazdvajanju kromosoma uz specifično nerazdvajanje kromosoma 21. Dobiveni rezultati su u skladu s podacima o nerazdvajanju kromosoma 21 u binuklearnim stanicama dobivenih u istraživanjima Abdel Hady-a i suradnika (139) te Migliore-a i suradnika (138). U navedenim istraživanjima nije provedena FISH-analiza sadržaja MN-a.

Ispitivanjem osjetljivosti na djelovanje MMC-a u našem istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima ukupnog broja MN-a između ispitivane i usporedne skupine niti zasebnom poredbom između majki i očeva ispitivane i usporedne skupine. Usporedba korigiranih vrijednosti broja MN-a induciranih MMC-om također nije pokazala statistički značajne razlike između ispitivane i usporedne skupine. Ipak, u ispitivanoj

skupini smo u 14,8% roditelja uočili znatno viši broj MN-a induciranih MMC-om. Slične rezultate dobili su Caria i suradnici (12) koji su statistički neznajno viši broj MN-a dobili nakon izlaganja MMC-u limfocita perifernih krvi roditelja djece s DS-om, u odnosu na skupinu roditelja zdrave djece. S obzirom da rezultati MN-testa i metode FISH, našeg kao i prethodno objavljenih istraživanja, upućuju na povećanu kromosomsku nestabilnost u roditelja djece s DS-om, jedno od mogućih objašnjenja zašto se ne uočava povećana osjetljivost na MMC, jest mogućnost da MMC ne djeluje specifično na kromosom 21. U prilog ovoj pretpostavci idu istraživanja kojima je FISH-analizom utvrđeno da MN-i u uzorcima tretiranim MMC-om češće sadrže kromosome 1, 9 i 16 (204). Suprotno, s manjom učestalošću od očekivane nalaze se kromosomi 8, 15 i 20. No, u navedenim istraživanjima nije zasebno ispitivana prisutnost kromosoma 21. Ipak, utvrđeno je da mutageni imaju različit utjecaj na specifične kromosome. Pri tome autori zaključuju kako je najveća učestalost kromosoma 1, 9 i 16 posljedica djelovanja MMC-a na stvaranje lomova i dekonenzaciju heterokromatinskih regija navedenih kromosoma (221).

Naše istraživanje potvrdilo je citotoksični učinak MMC-a na što ukazuju statistički značajno niže vrijednosti NDI-a nakon izlaganja MMC-u, u odnosu na vrijednosti NDI-a kod MN-testa. Nismo uočili razliku u vrijednostima NDI-a između ispitivane i usporedne skupine, što ukazuje na istu brzinu diobe stanica u obje grupe.

Usporedbom podataka prikupljenih anketnim upitnikom i rezultata dobivenih MN-testom htjeli smo ispitati postoji li povezanost između biomarkera određenih MN-testom (učestalost MN-a u binuklearnim i mononuklearnim stanicama, učestalost NPB-a i NBUD-ova, vrijednost NDI-a) i sociodemografskih obilježja, osobitosti medicinske i osobne anamneze, te životnih navika i izloženosti okolišnim čimbenicima. Vezano uz osobitosti medicinske anamneze statistički značajna povezanost uočena je za više parametara. Naši rezultati pokazuju da postoji pozitivna korelacija između broja spontanih pobačaja i učestalosti MN-a, NPB-a i NBUD-ova i broja MN-a u mononuklearnim stanicama, te problema s plodnošću i učestalosti MN-a i NBUD-ova. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjima Juberga i suradnika (134) koji su uočili veću učestalost MN-a u parova s više opetovanih pobačaja. Trková i suradnici (223) veći broj MN-a nalaze u parova s idiopatskom neplodnošću i parova s više opetovanih pobačaja. S obzirom na veliki broj mogućih molekularnih mehanizama, nije dokazana izravna povezanost između genomske nestabilnosti i navedenih stanja. No, pretpostavlja se da bi genomska nestabilnost mogla utjecati na vijabilnost ploda ili funkciju posteljice (155). Statistička analiza pokazala je da postoji sveza

između preboljene tuberkuloze i više biomarkera. No, s obzirom da je samo jedna ispitanica preboljela tuberkulozu i to unatrag četiri godine, na temelju ovog podatka ne možemo donositi zaključke. Isto tako samo jedan roditelj je imao člana obitelji oboljelog od cerebralne paralize pa se niti na temelju toga ne mogu interpretirati rezultati. Nadalje, dobili smo pozitivnu korelaciju uzimanja lijekova s učestalošću MN-a u mononuklearnim i binuklearnim stanicama. Statistički značajno veći broj roditelja ispitivane skupine se izjasnio pozitivno o uzimanju lijekova u različitim vremenskim periodima, u odnosu na usporednu skupinu. Lijekovi koje su uzimali roditelji ispitivane skupine uključivali su antibiotike, antihipertenzive, hormone štitnjače, nesteroidne antireumatike, antihistaminike, antidepresive i kortikosteroidne kreme. No valja istaknuti kako su svaki od navedenih lijekova uzimale tek po jedna ili dvije osobe, što nam isključuje mogućnost donošenja zaključka u svezi djelovanja svakog zasebnog lijeka. Prethodna istraživanja ukazuju da osim citostatika, uzimanje antihipertenziva kao što je atenolol ili zamjenske hormonske terapija u trudnica s prijetecim pobačajem utječu na povišenu učestalost MN-a (224,225). Analizom životnih navika roditelja nismo uočili svezu između konzumacije duhanskih proizvoda ili izloženosti duhanskom dimu i biomarkera analiziranih MN-testom. Rezultati dosadašnjih istraživanja vezanih uz utjecaj pušenja na učestalost MN-a su kontradiktorni (226,227). Bonassi i suradnici (225) istraživanjem provedenim u sklopu projekta HUMN na 5710 ispitanika, nalaze neznatno nižu razinu MN-a u pušača ili bivših pušača. Ipak, daljna analiza pokazala je znatno veću učestalost u osoba koje puše više od 30 cigareta dnevno. S obzirom da je većina pušača u našem istraživanju konzumirala 10 do 20 cigareta dnevno, ispitanike nismo dijelili u više skupina. Kopjar i suradnici u svom istraživanju navode da pušenje potiče spontani nastanak većeg broja MN-a (229). Nadalje, u našem istraživanju nismo uočili niti statistički značajnu povezanost između konzumacije alkohola i učestalosti MN-a. Ali smo uočili svezu između navike pijenja kave i većeg broja MN-a, što su potvrdila i dosadašnja istraživanja (230). U našem istraživanju smo uočili svezu između konzumacije folne kiseline i povećane učestalosti MN-a u mononuklearnim stanicama. Poznato je kako nedostatan unos folata uzokuje kromosomke lomove, ekspresiju fragilnih mjesta, hiometilaciju DNA te nastanak MN-a. Suprotno tome, prisutnost folne kiseline djeluje na sprečavanje kromosomskih lomova i regulaciju metilacije DNA (231). S obzirom da je više od 60% majki ispitivane i usporedne skupine uzimalo folnu kiselinu, vjerojatnije je da je naš nalaz viših vrijednosti MN-a u osoba koje su uzimale folnu kiselinu posljedica utjecaja drugih životnih navika ili okolišnih čimbenika. Važno je napomenuti i kako su gotovo sve majke folnu kiselinu uzimale u obliku multivitaminskih pripravaka, čime se ne može isključiti niti utjecaj drugih vitamina prisutnih

u navedenim pripravcima. Fenech i suradnici (174) uočavaju svezu između unosa visokih doza vitamina B12, riboflavina i biotina i viših učestalosti MN-a. Nadalje, nismo uočili svezu između ionizirajućeg zračenja i biomarkera određenih MN-testom. Iako prema kriteriju odabira parova, roditelji koji su sudjelovali u našem istraživanju nisu bili izloženi zračenju u posljednjih godinu dana, veliki broj ih je bio izložen u posljednjih 10 godina. Iako se smatra kako dijagnostičke doze ionizirajućeg zračenja ne bi trebale imati utjecaj na genomsku nestabilnost, ne smije se u potpunosti zanemariti utjecaj zračenja. U našem istraživanju uočili smo i povezanost između više razine MN-a i smještaja doma u blizini poljoprivrednog zemljišta. Naime, poznato je kako pesticidi, herbicidi te fungicidi uzrokuju kromosomska oštećenja te osim klastogenog učinka, neki pesticidi, ali i herbicidi imaju i aneugeni učinak (192,193).

Različiti su čimbenici koji mogu povisiti rizik rađanja kromosomski bolesnog ploda. Numeričke kromosomske abnormalnosti su u pravilu podrijetla *de novo* i ne možemo predvidjeti njihov nastanak. Prekonceptijsko određivanje rizika korištenjem različitih dijagnostičkih metoda koje bi trebalo uključiti mikronukleus-test s FISH–analizom bi nam omogućilo prepoznavanje osoba s višim predispozicijskim rizikom. Kompleksan proces nastanka slobodnog oblika DS-a uključuje ne samo genetičko molekularne mehanizme, nego i okolišne čimbenike. Korištenjem MN-a kao značajnog biomarkera genomske nestabilnosti integriranog s drugim dijagnostičkim testovima imalo bi mogući veliki značaj u procjeni visine reproduktivnog rizika i predispozicijskog statusa roditelja.

7. ZAKLJUČCI

- U parova ispitivane skupine nađena je statistički značajno veća učestalost mikronukleusa u binuklearnim stanicama perifernih krvi, u odnosu na usporednu skupinu ($p < 0,001$).
- Statistički značajno viša učestalost mikronukleusa utvrdila se u majki ispitivane skupine u odnosu na usporednu skupinu ($p = 0,021$). U očeva ispitivane skupine nađena je veća učestalost mikronukleusa u odnosu na usporednu skupinu, međutim razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,162$).
- Analizom krivulje osjetljivosti za učestalost mikronukleusa utvrđena je granična vrijednost mikronukleusa > 12 u skupini parova koji su imali trudnoću s DS-om, uz osjetljivost metode od 29,63% i specifičnost od 100%.
- U roditelja ispitivane skupine uočena je veća učestalost mikronukleusa u mononuklearnim stanicama u odnosu na usporednu skupinu, međutim razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,102$).
- Učestalost nukleoplazmatskih mostova u parova ispitivane skupine bila je viša u odnosu na usporednu skupinu, međutim razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,480$). Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti nuklearnih pupova između roditelja ispitivane i usporedne skupine ($p = 0,693$).
- Vrijednosti indeksa diobe jezgara nisu se značajno razlikovale između ispitivane i usporedne skupine ($p = 0,292$), niti zasebno između podskupina majki i očeva ispitivane i usporedne skupine.
- FISH-analizom uz primjenu pancentromerne probe u parova ispitivane skupine uočili smo veći udio mikronukleusa koji sadrže cijele kromosome, u odnosu na usporednu skupinu, međutim razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,292$). Primjenom centromerne probe 13/21 te mjesno specifične LSI 21q22 u parova ispitivane skupine uočili smo statistički značajno veći broj mikronukleusa koji sadrže kromosom 21, u odnosu na usporednu skupinu ($p = 0,032$). Statistički značajno veći udio binuklearnih stanica s nerazdvajanjem kromosoma 21 uočili smo u parova ispitivane skupine, u odnosu na usporednu skupinu ($p = 0,009$).
- Rezultati mikronukleus-testa i FISH-analize upućuju da mladi roditelji sa slobodnim oblikom Downova sindroma u anamnezi, imaju povećanu sklonost nerazdvajanju svih kromosoma, a posebice kromosoma 21 u limfocitima perifernih krvi.

- Nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru limfocita perifernih krvi nakon izlaganja mutagenu mitomicinu C između parova ispitivane i usporedne skupine ($p=0,676$).
- Uočena je pozitivna korelacija između reproduktivnih problema (prirodno začeće i broj spontanih pobačaja) te vrijednosti biomarkera određenih mikronukleus-testom.
- Ne uočava se statistički značajna sveza između navika konzumacije alkohola, izloženosti duhanskom dimu, ionizirajućem zračenju te kemikalijama iz radnog okoliša.
- Navika svakodnevnog pijenja kave pozitivno je korelirala s višom učestalošću mikronukleusa.
- Analizom osjetljivosti krivulje utvrdili smo graničnu vrijednost učestalosti mikronukleusa u svrhu predikcije začinjanja ploda s Downovim sindromom koja pokazuje tek dobru (osrednju) osjetljivost testa. Dobiveni rezultati pokazuju da mikronukleus-test ne možemo koristiti kao samostalan biomarker za procjenu rizika. Međutim, uz primjenu neke od neinvazivnih metoda probira rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda, mikronukleus-test i FISH-analiza mogli bi se koristiti za korekciju procjene rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda u idućim trudnoćama. Smatramo kako bi primjena ovog biomarkera u kombinaciji s drugim dijagnostičkim probirnim testovima mogla imati veliku važnost mladim roditeljima koji u anamnezi imaju trudnoću ili dijete sa slobodnim oblikom Downova sindroma.

8. SAŽETAK

Slobodni oblik Downova sindroma (trisomija 21) je najčešći kromosomski poremećaj i najčešći uzrok mentalne retardacije u humanoj populaciji. Otprilike 40% trudnoća s trisomijom 21 upravo se otkrije kod žena mlađih od 35 godina. Malo je literaturnih podataka o uzrocima povećane sklonosti pogrešnom razdvajanju kromosoma kod mladih parova koji u svojoj anamnezi imaju trudnoću ili dijete s Downovim sindromom. Svrha ovog rada bila je ispitati mogućnost primjene mikronukleus-testa i metode fluorescencijske *in situ* hibridizacije u procjeni rizika nastajanja brojčanih kromosomskih abnormalnosti u parova kod kojih su majke u dobi manjoj od 35 godina imale trudnoću ili rođeno dijete s trisomijom 21. U istraživanje je uključeno 60 roditelja ispitivane skupine (30 parova) koji su u dobi manjoj od 35 godina imali trudnoću ili dijete rođeno sa slobodnim oblikom Downova sindroma te 30 parova usporedne skupine (majke i očevi) s najmanje dva uredna poroda i bez povijesti reproduktivnih problema. Uslijed neadekvatnih preparata za analizu iz daljnjeg istraživanja isključena su tri para iz ispitivane skupine, te su sve daljnje analize provedene na ukupno 54 roditelja, odnosno 27 parova ispitivane skupine. U parova ispitivane skupine nađena je statistički značajno veća učestalost mikronukleusa u binuklearnim stanicama perifernih krvi, u odnosu na usporednu skupinu ($p < 0,001$). Kao granična vrijednost utvrđen je ukupan broj mikronukleusa >12 , uz osjetljivost metode od 29,63% i specifičnost od 100%. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivane i usporedne skupine u učestalosti mikronukleusa u mononuklearnim stanicama ($p=0,102$) te učestalosti nuklearnih pupova ($p=0,693$) i nukleoplazmatskih mostova ($p=0,480$). Fluorecencijskom *in situ* hibridizacijom uz primjenu pancentromerne probe u parova ispitivane skupine uočili smo veći postotak mikronukleusa koji sadrže cijele kromosome, te statistički značajno veći broj mikronukleusa koji sadrže kromosom 21 ($p=0,009$), u odnosu na usporednu skupinu. Nije uočena statistički značajna razlika u odgovoru limfocita perifernih krvi nakon izlaganja mutagenu mitomicinu C između parova ispitivane i usporedne skupine ($p=0,676$). Rezultati mikronukleus-testa i fluorescencijske *in situ* hibridizacije upućuju da mladi roditelji sa slobodnim oblikom Downova sindroma u anamnezi imaju povećanu sklonost nerazdvajanju kromosoma u limfocitima perifernih krvi. S obzirom na osrednju osjetljivost testa, mikronukleus metoda bi se u kombinaciji s fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom, mogla primijeniti kao komplementarni biomarker za korekciju procjene rizika rađanja kromosomski bolesnog ploda u idućim trudnoćama.

9. SUMMARY

APPLICATION OF MICRONUCLEUS ASSAY AND FLUORESCENCE HYBRIDIZATION IN ESTIMATION OF CHROMOSOME INSTABILITY AND OCCURRENCE OF REGULAR FORM OF DOWN SYNDROME IN YOUNG COUPLES

Ana Vičić, 2019

The aim of this study was to evaluate the application of micronucleus assay and fluorescence *in situ* hybridization in estimation of chromosome instability and occurrence of regular form of Down syndrome within young couples. Study group consisted of 60 parents (30 couples) who had previous pregnancy with regular form of Down syndrome at the age of 35 or less. Control group consisted of 30 couples with two healthy children and no previous spontaneous abortions. Parents in the study group had statistically significant higher frequency of micronuclei in binucleated cells, in comparison with parents in the control group ($p < 0.001$). As a limit value for the micronucleus frequency >12 was determined, with a sensitivity for micronucleus test of 29.63% and a specificity of 100%. There was no statistically significant difference between study and control group in the frequency of micronuclei in mononuclear cells ($p = 0.102$), the frequency of nuclear buds ($p = 0.693$), and the frequency of nucleoplasmatic bridges ($p = 0.480$). Fluorescence *in situ* hybridization showed higher percentage of micronuclei containing whole chromosomes as well as statistically significant higher number of micronuclei containing chromosome 21 ($p = 0.009$), in comparison to control group. There was no statistically significant difference between two patients' groups in the response of peripheral blood lymphocytes after treatment with mutagen mitomycin C ($p = 0.676$). In conclusion, the results of the micronucleus test and fluorescence *in situ* hybridization suggest that young parents with a history of regular form of Down syndrome have a higher susceptibility to chromosome nondisjunction in peripheral blood lymphocytes. Given the fair sensitivity, micronucleus test combined with fluorescence *in situ* hybridization could be implemented as a complementary biomarker for the correction of risk assessment of having chromosomal abnormality in subsequent pregnancies.

10. LITERATURA

1. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8:117–34.
2. Loane M, Morris JK, Addor MC, Arriola L, Budd J, Doray B i sur. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21(1):27-33.
3. de Graaf G, Engelen JJM, Gijsbers ACJ, Hochstenbach R, Hoffer MJV, Kooper AJA i sur. Estimates of live birth prevalence of children with Down syndrome in the period 1991-2015 in the Netherlands. *J Intellect Disabil Res.* 2017;61(5):461-70.
4. Gardner RJM, Amor DJ. Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling. Fifth Edition. Oxford; New York: Oxford University Press;2018.
5. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1959;248(11):1721-2. French.
6. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA i sur. The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep.* 2007;122(1):62-72.
7. Oliver TR, Bhise A, Feingold E, Tinker S, Masse N, Sherman SL. Investigation of factors associated with paternal nondisjunction of chromosome 21. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(8):1685-90.
8. Coppedè F. Risk factors for Down syndrome. *Arch Toxicol.* 2016;90(12):2917-29.
9. Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA 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(1):41-52.
10. Rowsey R, Kashevarova A, Murdoch B, Dickenson C, Woodruff T, Cheng E i sur. Germline mosaicism does not explain the maternal age effect on trisomy. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(10):2495-503.
11. Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M i sur. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet.* 2008;4(3):e1000033.
12. Caria H, Chaveca T, Rueff J. Aneuploidy induced in lymphocytes of parents of trisomic 21 children. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2001; 21(5):369-82.

13. Migliore L, Migheli F, Coppedè F. Susceptibility to aneuploidy in young mothers of Down syndrome children. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:1052-60. Review.
14. Silva-Grecco RL, Navarro GC, Cruz RM, Balarin MAS. Micronucleated lymphocytes in parents of Down syndrome children. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(7):573-7.
15. Krishna Murthy DS, Farag TI. Recurrent regular trisomy-21 in two Bedouin families. Parental mosaicism versus genetic predisposition. *Ann Genet*. 1995;38(4):217-24.
16. Bruyère H, Rupp R, Kuchinka BD, Friedman JM, Robinson WP. Recurrent trisomy 21 in a couple with a child presenting trisomy 21 mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 21 in the euploid cell line. *Am J Med Genet*. 2000;94(1):35-41.
17. Frias S, Ramos S, Molina B, del Castillo V, Mayén DG. Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. *Mutat Res*. 2002;520(1-2):25-37.
18. Kovaleva NV. Germ-line transmission of trisomy 21: Data from 80 families suggest an implication of grandmaternal age and a high frequency of female-specific trisomy rescue. *Mol Cytogenet*. 2010;3:7.
19. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000;445:81-95.
20. Irving C, Basu A, Richmond S, Burn J, Wren C. Twenty-year trends in prevalence and survival of Down syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2008;16:1336-40.
21. Jacobs M, Cooper S-A, McGowan R, Nelson SM, Pell JP. Pregnancy Outcome following Prenatal Diagnosis of Chromosomal Anomaly: A Record Linkage Study of 26,261 Pregnancies. *PLoS ONE*. 2016;11(12):e0166909.
22. Glivetic T, Rodin U, Milosevic M, Mayer D, Filipovic-Grcic B, Seferovic Saric M. Prevalence, prenatal screening and neonatal features in children with Down syndrome: a registry-based national study. *Ital J Pediatr*. 2015;41:81.
23. Down JLH. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports*. 1866; 3:259–62.
24. Weijerman ME, de Winter JP. Clinical practice. The care of children with Down syndrome. *Eur J Pediatr*. 2010;169(12):1445-52.
25. Tedeschi AS, Roizen NJ, Taylor HG, Murray G, Curtis CA, Parikh AS. The prevalence of congenital hearing loss in neonates with Down syndrome. *J Pediatr*. 2015;166(1):168-71.
26. Kreicher KL, Weir FW, Nguyen SA, Meyer TA. Characteristics and Progression of Hearing Loss in Children with Down Syndrome. *J Pediatr*. 2018;193:27-33.e2.
27. Roizen NJ, Mets MB, Blondis TA. Ophthalmic disorders in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 1994;36(7):594-600.

28. Krinsky-McHale SJ, Jenkins EC, Zigman WB, Silverman W. Ophthalmic disorders in adults with down syndrome. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2012;2012:974253.
29. Madan V, Williams J, Lear JT. Dermatological manifestations of Down's syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(5):623-9. Review.
30. Aversa T, Crisafulli G, Zirilli G, De Luca F, Gallizzi R, Valenzise M. Epidemiological and clinical aspects of autoimmune thyroid diseases in children with Down's syndrome. *Ital J Pediatr.* 2018;44(1):39.
31. Qiao B, Austin AA, Schymura MJ, Browne ML. Characteristics and survival of children with acute leukemia with Down syndrome or other birth defects in New York State. *Cancer Epidemiol.* 2018 Oct 13;57:68-73. doi: 10.1016/j.canep.2018.10.004. [Epub ahead of print]
32. Hasle H, Friedman JM, Olsen JH, Rasmussen SA. Low risk of solid tumors in persons with Down syndrome. *Genet Med.* 2016;18(11):1151-57.
33. Bayen E, Possin KL, Chen Y, Cleret de Langavant L, Yaffe K. Prevalence of Aging, Dementia, and Multimorbidity in Older Adults With Down Syndrome. *JAMA Neurol.* 2018 Jul 22. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.2210. [Epub ahead of print]
34. Pradhan M, Dala A, Khan F, Agrawal S. Fertility in men with Down syndrome: a case report. *Fertil Steril.* 2006;86(6):1765e1-3.
35. Covelli V, Raggi A, Meucci P, Paganelli C, Leonardi M. Ageing of people with Down's syndrome: a systematic literature review from 2000 to 2014. *Int J Rehabil Res.* 2016;39(1):20-8.
36. Englund A, Jonsson B, Zander CS, Gustafsson J, Annerén G. Changes in mortality and causes of death in the Swedish Down syndrome population. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(4):642-9.
37. Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M i sur. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet.* 1993;1(2):114-24.
38. Park J, Chung KC. New Perspectives of Dyrk1A Role in Neurogenesis and Neuropathologic Features of Down Syndrome. *Exp Neurobiol.* 2013;22(4):244-8.
39. Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnebin M, Delucinge Vivier C, Delorenzi M i sur. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet.* 2007;81(2):252-63.

40. Costa V, Angelini C, D'Apice L, Mutarelli M, Casamassimi A, Sommese L i sur. Massive-scale RNA-Seq analysis of non ribosomal transcriptome in human trisomy 21. *PLoS One*. 2011;6(4):e18493.
41. Antonarakis SE. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat Rev Genet*. 2017;18(3):147-163.
42. Karmiloff-Smith A, Al-Janabi T, D'Souza H, Groet J, Massand E, Mok K i sur. The importance of understanding individual differences in Down syndrome. *F1000Res*. 2016;23;5.
43. Bacalini MG, Gentilini D, Boattini A, Giampieri E, Pirazzini C, Giuliani C i sur. Identification of a DNA methylation signature in blood cells from persons with Down Syndrome. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(2):82-96.
44. Devlin L, Morrison PJ. Accuracy of the clinical diagnosis of Down syndrome. *Ulster Med J*. 2004 May;73(1):4-12.
45. Jenkins EC, Schupf N, Genovese M, Ye LL, Kapell D, Canto B i sur. Increased low-level chromosome 21 mosaicism in older individuals with Down syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;68:147-51.
46. Shi Q, Adler I-D, Zhang J, Zhang X, Shan X, Martin R. Incidence of mosaic cell lines in vivo and malsegregation of chromosome 21 in lymphocytes in vitro of trisomy 21 patients: detection by fluorescence in situ hybridization on binucleated lymphocytes. *Hum Genet*. 2000;106:29-35.
47. Vičić A, Hafner T, Bekavac Vlatković I, Korać P, Habek D, Stipoljev F. Prenatal diagnosis of Down syndrome: A 13-year retrospective study. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017;56(6):731-5.
48. Alldred SK, Takwoingi Y, Guo B, Pennant M, Deeks JJ, Neilson JP, Alfirevic Z. First and second trimester serum tests with and without first trimester ultrasound tests for Down's syndrome screening. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3:CD012599.
49. Kagan KO, Sonek J, Wagner P, Hoopmann M. Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnosis: screening for chromosomal abnormalities. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(4):645-651.
50. Morris JK, Wald NJ, Watt HC. Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn*. 1999;19(2):142-5.
51. Savva GM, Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn*. 2006;26(6):499-504.

52. Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003;21:313–21.
53. Penrose LS. Some notes on heredity counseling. *Acta Genet Stat Med.* 1956;6(1 Part 2):35-40.
54. Mikkelsen M, Stene J. Genetic counselling in Down's syndrome. *Hum Hered.* 1970;20(5):457-64.
55. Stene J. Detection of higher recurrence risk for age-dependent chromosome abnormalities with an application to trisomy G1. (Down's syndrome). *Hum Hered.* 1970;20(1):112-22.
56. Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):376-85.
57. Grande M, Stergiotou I, Borobio V, Sabrià J, Soler A, Borrell A. Heterotrisomy recurrence risk: a practical maternal age-dependent approach for excess trisomy 21 risk calculation after a previous autosomal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(13):1613-5.
58. James RS, Ellis K, Pettay D, Jacobs PA. Cytogenetic and molecular study of four couples with multiple trisomy 21 pregnancies. *Eur J Hum Genet.* 1998;6(3):207-12.
59. Hultén MA, Jonasson J, Nordgren A, Iwarsson E. Germinal and Somatic Trisomy 21 Mosaicism: How Common is it, What are the Implications for Individual Carriers and How Does it Come About? *Curr Genomics.* 2010;11(6):409-19.
60. Ghosh S, Hong CS, Feingold E, Ghosh P, Ghosh P, Bhaumik P i sur. Epidemiology of Down syndrome: new insight into the multidimensional interactions among genetic and environmental risk factors in the oocyte. *Am J Epidemiol.* 2011;174(9):1009-16.
61. Sperling K, Neitzel H, Scherb H. Evidence for an increase in trisomy 21 (Down syndrome) in Europe after the Chernobyl reactor accident. *Genet Epidemiol.* 2012;36(1):48-55.
62. Ghosh S, Bhaumik P, Ghosh P, Dey SK. Chromosome 21 non-disjunction and Down syndrome birth in an Indian cohort: analysis of incidence and aetiology from family linkage data. *Genet Res (Camb).* 2010;92(3):189-97.
63. Vraneković J, Božović IB, Grubić Z, Wagner J, Pavlinić D, Dahoun S i sur. Down syndrome: parental origin, recombination, and maternal age. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(1):70-3.
64. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS i sur. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000;405(6784):311-9.

65. Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet.* 1995;4(10):1935-44.
66. Eggermann T, Schönherr N, Spengler S, Jäger S, Denecke B, Binder G i sur. Identification of a 21q22 duplication in a Silver-Russell syndrome patient further narrows down the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(2):356-9.
67. Nakamura A, Hattori M, Sakaki Y. A novel gene isolated from human placenta located in Down syndrome critical region on chromosome 21. *DNA Res.* 1997;4:321-4.
68. Lyle R, Bena F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A i sur. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(4):454-66.
69. Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(4):523-31.
70. Balarin MAS, Cintra MTR, Cordeiro F, Naves L, da Silva-Grecco RL. Screening of six polymorphisms related with folate metabolism in parents of individuals with Down syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;27:1-7.
71. 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;10(5):e0127423.
72. Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999;13(3):167-70.
73. Roig I, Robles P, Garcia R, Martin M, Egozcue J, Cabero L i sur. Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod.* 2005;20(9):2463-9.
74. Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA. Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol.* 2010;20(17):1522-8.
75. Lister LM, Kouznetsova A, Hyslop LA, Kalleas D, Pace SL, Barel JC i sur. Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr Biol.* 2010;20(17):1511-21.
76. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Sandalinas M, Brenner CA. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(1):49-55.

77. McGuinness BE, Anger M, Kouznetsova A, Gil-Bernabé AM, Helmhart W, Kudo NR i sur. Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr Biol.* 2009;19(5):369-80.
78. Hultén MA, Öijerstedt L, Iwarsson E, Jonasson J. Maternal Germinal Trisomy 21 in Down Syndrome. *J Clin Med.* 2014;3(1):167-75.
79. Ghosh S, Ghosh P. Genetic Etiology of Chromosome 21 Nondisjunction and Down syndrome Birth: Aberrant Recombination and Beyond. *J Down Syndr Chr Abnorm.* 2015; 1(1):1-5.
80. Huang T, Meschino WS, Okun N, Dennis A, Hoffman B, Lepage N i sur. The impact of maternal weight discrepancies on prenatal screening results for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2013;33(5):471-6.
81. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):266-72.
82. Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D. Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):395-404.
83. van Montfrans JM, Dorland M, Oosterhuis GJ, van Vugt JM, Rekers-Mombarg LT, Lambalk CB. Increased concentrations of follicle-stimulating hormone in mothers of children with Down's syndrome. *Lancet.* 1999;353:1853-4.
84. Ghosh S, Feingold E, Chakraborty S, Dey SK. Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. *Hum Genet.* 2010;127(4):403-9.
85. Siderakis M, Tarsounas M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res.* 2007;15(5):667-79.
86. Albizua I, Rambo-Martin BL, Allen EG, He W, Amin AS, Sherman SL. Association between telomere length and chromosome 21 nondisjunction in the oocyte. *Hum Genet.* 2015;134(11-12):1263-70.
87. Krem MM, Press OW, Horwitz MS, Tidwell T. Mechanisms and clinical applications of chromosomal instability in lymphoid malignancy. *Br J Haematol.* 2015;171(1):13-28.
88. Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update.* 2008;14(2):143-58.
89. Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am J Hum Genet.* 2005;76(1):91-9.

90. Saiyed N, Bakshi S, Muthuswamy S, Agarwal S. Young mothers and higher incidence of maternal meiosis-I non- disjunction: Interplay of environmental exposure and genetic alterations during halt phase in trisomy 21. *Reprod Toxicol*. 2018;79:1-7.
91. Kouznetsova A, Benavente R, Pastink A, Höög C. Meiosis in mice without a synaptonemal complex. *PLoS One*. 2011;6(12):e28255.
92. Sherman SL, Lamb NE, Feingold E. Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 4):578-80.
93. Oliver TR, Tinker SW, Allen EG, Hollis N, Locke AE, Bean LJ i sur. Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Hum Genet*. 2012;131(7):1039-46.
94. Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J, Cieslak Janzen J. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(1):2-8.
95. Winkels RM, Brouwer IA, Siebelink E, Katan MB, Verhoef P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(2):465-73.
96. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev*. 2004;62:S3-12;
97. Gjergja R, Stipoljev F, Hafner T, Tezak N, Luzar-Stiffler V. Knowledge and use of folic acid in Croatian pregnant women--a need for health care education initiative. *Reprod Toxicol*. 2006;21(1):16-20.
98. 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(1):75-81.
99. Thomas D, Chandra J, Sharma S, Jain A, Pemde HK. Determinants of Nutritional Anemia in Adolescents. *Indian Pediatr*. 2015;52(10):867-9.
100. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB 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(4):495-501.
101. Lees-Murdock DJ, Walsh CP. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Epigenetics*. 2008;3(1):5-13.
102. Sheaffer KL, Elliott EN, Kaestner KH. DNA Hypomethylation Contributes to Genomic Instability and Intestinal Cancer Initiation. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016;9(7):534-46.

103. Shelnutt KP, Kauwell JP, Gregory JF 3rd, Maneval DR, Quinlivan EP, Theriaque DW i sur. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem.* 2004;15:554–60.
104. Rai V, Yadav U, Kumar P, Yadav SK, Mishra OP. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and down syndrome risk: a meta-analysis from 34 studies. *PLoS One.* 2014;9(9):e108552.
105. Gu Y. Association between polymorphisms in folate metabolism genes and maternal risk for Down syndrome: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2017;7(3):367-377.
106. Coppedè F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L i sur. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett.* 2009;449(1):15-9.
107. Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V, Migheli F, Barone C, Antonucci I i sur. The MTR 2756A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome: a case-control study and a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40(12):6913-25.
108. Hildebrand E, Källén B, Josefsson A, Gottvall T, Blomberg M. Maternal obesity and risk of Down syndrome in the offspring. *Prenat Diagn.* 2014;34(4):310-5.
109. Torfs CP, Christianson RE. Effect of maternal smoking and coffee consumption on the risk of having a recognized Down syndrome pregnancy. *Am J Epidemiol.* 2000;152(12):1185-91.
110. Yang Q, Sherman SL, Hassold TJ, Allran K, Taft L, Pettay D i sur. Risk factors for trisomy 21: maternal cigarette smoking and oral contraceptive use in a population-based case-control study. *Genet Med.* 1999;1(3):80-8.
111. Flom JD, Ferris JS, Liao Y, Tehranifar P, Richards CB, Cho YH i sur. Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(12):2518-23.
112. Dolk H, Vrijheid M. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *Br Med Bull.* 2003;68:25-45.
113. Choi I. Does wastewater discharge have relations with increase of Turner syndrome and Down syndrome? *Environ Health Toxicol.* 2017;32:e2017012.
114. Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, Olsson CA, Liberson GL. The influence of paternal age on down syndrome. *J Urol.* 2003;169(6):2275-8.

115. Steiner B, Masood R, Rufibach K, Niedrist D, Kundert O, Riegel M i sur. An unexpected finding: younger fathers have a higher risk for offspring with chromosomal aneuploidies. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):466-72.
116. Ren H, Ferguson K, Kirkpatrick G, Vinning T, Chow V, Ma S. Altered Crossover Distribution and Frequency in Spermatocytes of Infertile Men with Azoospermia. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156817.
117. Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev.* 2001;59(4):417-21.
118. Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(10):634-43.
119. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski L, Hawuła W i sur. Lifestyle factors and sperm aneuploidy. *Reprod Biol.* 2014;14(3):190-9.
120. Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM, Block G, Wyrobek AJ. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Hum Reprod.* 2008;23(5):1014-22.
121. Radwan M, Jurewicz J, Wielgomas B, Piskunowicz M, Sobala W, Radwan P i sur. The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. *Chemosphere.* 2015;128:42-8.
122. Radwan M, Jurewicz J, Polańska K, Sobala W, Radwan P, Bochenek M i sur. Exposure to ambient air pollution--does it affect semen quality and the level of reproductive hormones? *Ann Hum Biol.* 2016;43(1):50-6.
123. Cagnetta A, Lovera D, Grasso R, Colombo N, Canepa L, Ballerini F, Calvio M, Miglino M, Gobbi M, Lemoli R, Cea M. Mechanisms and Clinical Applications of Genome Instability in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int.* 2015;2015:943096.
124. Maluf SW, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Jan 1;124(1):71-5.
125. Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol.* 2010;20(6):R285-95.
126. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, Finley JC, Shen WT, Emerson S i sur. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet.* 2002;32(2):280-4.
127. Mathur R, Chowdhury MR, Singh G. Recent advances in chromosome breakage syndromes and their diagnosis. *Indian Pediatr.* 2000;37(6):615-25.

128. Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L i sur. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res.* 2001;498(1-2):159-67.
129. Chang JL, Hinrich AJ, Roman B, Norrbom M, Rigo F, Marr RA i sur. Targeting Amyloid- β Precursor Protein, APP, Splicing with Antisense Oligonucleotides Reduces Toxic Amyloid- β Production. *Mol Ther.* 2018;26(6):1539-51.
130. Schupf N, Kapell D, Lee JH, Ottman R, Mayeux R. Increased risk of Alzheimer's disease in mothers of adults with Down's syndrome. *Lancet.* 1994;344(8919):353-6.
131. Schupf N, Kapell D, Nightingale B, Lee JH, Mohlenhoff J, Bewley S i sur. Specificity of the fivefold increase in AD in mothers of adults with Down syndrome. *Neurology.* 2001;57(6):979-84.
132. Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Yurov YB. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiol Dis.* 2009;34(2):212-20.
133. Hultén MA, Jonasson J, Iwarsson E, Uppal P, Vorsanova SG, Yurov YB i sur. Trisomy 21 mosaicism: we may all have a touch of Down syndrome. *Cytogenet Genome Res.* 2013;139(3):189-92.
134. Juberg RC, Knops J, Mowrey PN. Increased frequency of lymphocytic mitotic non-disjunction in recurrent spontaneous aborters. *J Med Genet.* 1985;22:32-5.
135. Daniely M, Aviram A, Carp HJ, Shaki R, Barkai G. The association between sporadic somatic parental aneuploidy and chromosomally abnormal placentae in habitual abortions. *Early Pregnancy.* 2001;5(3):153-63.
136. Staessen C, Maes AM, Kirsch-Volders M, Susanne C. Is there a predisposition for meiotic nondisjunction that may be detected by mitotic hyperploidy? *Clin Genet.* 1983;24(3):184-90.
137. Rudd NL, Hoar DI, Martin RH, Kemp D, Dimnik L. Factors distinguishing couples at risk for nondisjunction. *Can J Genet Cytol.* 1984;26(5):595-606.
138. Migliore L, Boni G, Bernardini R, Trippi F, Colognato R, Fontana I i sur. Susceptibility to chromosome malsegregation in lymphocytes of women who had a Down syndrome child in young age. *Neurobiol Aging.* 2006;27(5):710-6.
139. Abdel Hady S, Afifi HH, Abdel Ghany EA, Taher MB, Eid MM. Micronucleus assay as a biomarker for chromosome malsegregation in young mothers with Down syndrome children. *Genet Couns.* 2015;26(1):13-9.

140. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 1973;18(2):187-90.
141. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;31(1):9-15.
142. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976;41(2-3):321-32.
143. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985;147(1-2):29-36.
144. Rosefort C, Fauth E, Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis.* 2004;19(4):277-84.
145. Kirsch-Volders M, Fenech M, Bolognesi C. Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutat Res.* 2018;836(Pt A):47-52.
146. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006;88:1515-31.
147. Müller WU, Schlusen I, Streffer C. Direct evidence that radiation induced micronuclei of early embryos require a mitosis for expression. *Radiat Environ Biophys.* 1991;30(2):117-22.
148. Leach NT, Jackson-Cook C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? *Mutat Res.* 2004;554(1-2):89-94.
149. Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis.* 2002;17(4):337-44.
150. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J i sur. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26(1):125-32.
151. Zyss D, Gergely F. Centrosome function in cancer: guilty or innocent? *Trends Cell Biol.* 2009;19(7):334-46.
152. Suzuki T, Fujii M, Ayusawa D. Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 2002;37(8-9):1005-14.

153. Hassan KM, Norwood T, Gimelli G, Gartler SM, Hansen RS. Satellite 2 methylation patterns in normal and ICF syndrome cells and association of hypomethylation with advanced replication. *Hum Genet.* 2001;109:452-62.
154. Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G i sur. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res.* 2004;64:4472-80.
155. Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res.* 2004;551(1-2):167-80.
156. Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V, Denaro M, Anello G, Antonucci I 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(9):5571-83.
157. Bakhoun SF, Genovese G, Compton DA. Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. *Curr Biol.* 2009;19(22):1937-42.
158. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;534:65-75.
159. Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis.* 2003;18(2):187-94.
160. Wu J, Lyons GH, Graham RD, Fenech MF. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutagenesis.* 2009;24:225–32.
161. Cimini D, Antocchia A, Tanzarella C, Degrossi F. Topoisomerase II inhibition in mitosis produces numerical and structural chromosomal aberrations in human fibroblasts. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;76(1–2):61–7.
162. Pampalona J, Roscioli E, Silkworth WT, Bowden B, Genescà A, Tusell L i sur.. Chromosome Bridges Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment throughout Mitosis and Rarely Break during Anaphase. *PLoS One.* 2016 ;11(1):e0147420.
163. Ganem NJ, Pellman D. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J Cell Biol.* 2012;199(6):871-81.

164. Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat. Res.* 2007;617:33–45.
165. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res.* 2008;658(3):215-33.
166. Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res.* 2004;556(1-2):169-81.
167. Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011;26(1):33-42.
168. Silva Mdo C, Gaspar J, Duarte Silva I, Faber A, Rueff J. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes and the genotoxicity of hydroquinone in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2004;43(4):258-64.
169. Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S i sur. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(5):1038-42.
170. Ishikawa H, Ishikawa T, Yamamoto H, Fukao A, Yokoyama K. Genotoxic effects of alcohol in human peripheral lymphocytes modulated by ADH1B and ALDH2 gene polymorphisms. *Mutat Res.* 2007;615(1-2):134-42.
171. Trenz K, Rothfuss A, Schütz P, Speit G. Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat Res.* 2002;500(1-2):89-96.
172. Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, de Ridder L, Vral A. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int. J. Radiat. Biol.* 2004;80:745-56.
173. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L i sur. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing.* 1999;28(4):393-7.
174. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011;26(1):43-9.

175. Palazzo RP, Jardim LB, Bacellar A, de Oliveira FR, Maraslis FT, Pereira CHJ i sur. DNA damage and repair in individuals with ataxia-telangiectasia and their parents. *Mutat Res.* 2018;836(Pt B):122-6.
176. Kazimírová A, Barancoková M, Dzupinková Z, Wsóllová L, Dusinská M. Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res.* 2009;661(1-2):35-40.
177. Ferreira FL, Prá D, Martino-Roth MG, Garcias GL. Buccal micronucleus frequency is associated with age in Down syndrome. *Genet Mol Res.* 2009;8(4):1231-7.
178. Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S i sur. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol.* 2007;165(1):36-43.
179. Milošević-Djordjević O, Grujčić D, Vasković Z, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku J Exp Med.* 2010;220:115-20.
180. Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernardini S i sur. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurol Sci.* 2002;23(2):97-8.
181. Migliore L, Coppedè F, Fenech M, Thomas P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis.* 2011;26(1):85-92.
182. Witczak M, Ferenc T, Gulczyńska E, Nowakowska D, Łopaczyńska D, Wilczyński J. Elevated frequencies of micronuclei in pregnant women with type 1 diabetes mellitus and in their newborns. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014;763:12-7.
183. Petcu I, Savu D, Thierens H, Nagels G, Vral A. In vitro radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis patients. *Int J Radiat Biol.* 2006;82(11):793-803.
184. Karaman A, Binici DN, Melikoğlu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutat Res.* 2011;721(1):1-5.
185. Moghbeli-Nejad S, Mozdarani H, Aleyasin A. Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(1):89-94.
186. Toljic M, Egic A, Munjas J, Karadzov Orlic N, Milovanovic Z, Radenkovic A i sur. Increased oxidative stress and cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. *Reprod Toxicol.* 2017;71:55-62.

187. Šošić GM, Jović N, Rakić B, Dimitrijević A, Varjačić M. Association Between Inherited Thrombophilia in Pregnancy and Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes. *Balkan J Med Genet.* 2017;20(2):1-18.
188. Fenech M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. *Mutagenesis.* 2011;26(1):63-7.
189. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin Y, Chang WP i sur. The HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 2003;543:155-66.
190. Ishikawa H, Tian Y, Yamauchi T. Influence of gender, age and lifestyle on micronuclei frequency in healthy Japanese population. *J Occup Health.* 2003;45:179-81.
191. Ladeira C, Carolino E, Gomes MC, Brito M. Role of Macronutrients and Micronutrients in DNA Damage: Results From a Food Frequency Questionnaire. *Nutr Metab Insights.* 2017;10:1178638816684666.
192. Željezić D, Žunec S, Bjeliš M, Benković V, Mladinić M, Lovaković Tariba B i sur. Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbuthylazine on DNA integrity in human and mouse cells. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(19):19065-81.
193. Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis.* 2006;21(2):93-103.
194. Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet.* 2013;4:131.
195. Vasilyev SA, Timoshevskii VA, Lebedev IN. Aneugenic effect of ionizing radiation in mammalian and human somatic cells. *Russian Journal of Genetics.* 2009;5(12):1403-12.
196. Gajski G, Milković D, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Garaj-Vrhovac V. Application of dosimetry systems and cytogenetic status of the child population exposed to diagnostic X-rays by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *J Appl Toxicol.* 2011;31(7):608-17.
197. Ionescu ME, Ciocirlan M, Becheanu G, Nicolaie T, Ditescu C, Teiusanu AG i sur. Nuclear Division Index may Predict Neoplastic Colorectal Lesions. *Maedica (Buchar).* 2011;6(3):173-8.
198. İpek E, Ermiş E, Uysal H, Kızılet H, Demirelli S, Yıldırım E i sur. The relationship of micronucleus frequency and nuclear division index with coronary artery disease SYNTAX and Gensini scores. *Anatol J Cardiol.* 2017;17(6):483-9.

199. Minozzo R, Deimling L.I, Petrucci Gigante L. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead. *Mutation Research*. 2004;565:53–60.
200. Ruchirawat M, Cebulska-Wasilewska A, Au WW. Evidence for exposure-induced DNA repair abnormality is indicative of health and genetic risk. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(5):566-73.
201. Erdei E, Lee SJ, Wei Q, Wang LE, Song YS, Bovbjerg D i sur. Reliability of mutagen sensitivity assay: an inter-laboratory comparison. *Mutagenesis*. 2006;21(4):261-4.
202. Oberheitmann B, Frentzel-Beyme R, Hoffmann W. An application of the challenge assay in boat builders exposed to low levels of styrene--a feasibility study of a possible biomarker for acquired susceptibility. *Int J Hyg Environ Health*. 2001;204(1):23-9.
203. Schlade-Bartusiak K, Stembalska-Kozłowska A, Bernady M, Kudyba M, Sasiadek M. Analysis of adaptive response to bleomycin and mitomycin C. *Mutat Res*. 2002;513(1-2): 75-81.
204. Noll DM, Mason TM, Miller PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev*. 2006;106(2):277-301.
205. Fauth E, Scherthan H, Zankl H. Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C- and diethylstilboestrol-induced micronuclei. *Mutagenesis*. 2000;15(6):459-67.
206. Hovhannisyan G, Aroutiounian R, Liehr T. Chromosomal composition of micronuclei in human leukocytes exposed to mitomycin C. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(4):316-22.
207. Chow SC, Shao J, Wang H. *Sample Size Calculations in Clinical Research*. New York: Marcel Dekker; 2003.
208. Colton T. *Statistics in Medicine*. Boston: Little Brown and Company;1974.
209. Swets JA, Dawes RM, Monahan J. Psychological Science Can Improve Diagnostic Decisions. *Psychol Sci Public Interest*. 2000;1(1):1-26.
210. Kovaleva NV, Butomo IV, Körblein A. [Sex ratio in Down syndrome. Studies in patients with confirmed trisomy 21]. *Tsitol Genet*. 2001;35(6):43-9. [članak na ruskom]
211. Petersen MB, Antonarakis SE, Hassold TJ, Freeman SB, Sherman SL, Avramopoulos D i sur. Paternal nondisjunction in trisomy 21: excess of male patients. *Hum Mol Genet*. 1993;2(10):1691-5.
212. Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Feingold E, Hassold TJ. Sex ratio in normal and disomic sperm: evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome. *Am J Hum Genet*. 1996;59(5):1108-13.

213. Hultén MA, Patel SD, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Jonasson J i sur. On the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet.* Feb 23;3:4.
214. Naim V, Rosselli F. The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol.* 2009;11,761–8.
215. Nasmyth K, Haering CH. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem.* 2005;74,595–648.
216. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet.* 2001;28(2):155-9.
217. Beadling C, Smith KA. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med Immunol.* 2002;18(1):2.
218. Karttunen R, Nurmi T, Ilonen J, Surcel HM. Cell-mediated immunodeficiency in Down's syndrome: normal IL-2 production but inverted ratio of T cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 1984;55(2):257-63.
219. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet.* 2010;37(4):233-7.
220. Stabile A, Sopo SM, Stabile AM, Viola L, Minchilli G, Pesaresi MA. Serum IgE Levels and In Vitro Production of IL-2, IL-4, and IFN- γ in Children with Down's Syndrome. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology.* 1994;8(4):219–5.
221. Hovhannisyan G, Aroutiounian R, Babayan N, Harutyunyan T, Liehr T. Comparative analysis of individual chromosome involvement in micronuclei induced by mitomycin C and bleomycin in human leukocytes. *Mol Cytogenet.* 2016;9:49.
222. Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis.* 2003;18:221–33.
223. Trková M, Kapras J, Bobková K, Stanková J, Mejsnarová B. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reprod Toxicol.* 2000;14(4):331-5.
224. Téllez M, Martínez B, Criado B, Lostao CM, Penagarikano O, Ortega B i sur. In vitro and in vivo evaluation of the antihypertensive drug atenolol in cultured human lymphocytes: effects of long-term therapy. *Mutagenesis.* 2000;15(3):195-202.
225. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP i sur. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 2003;543(2):155-66.

226. Milosević-Ethordević O, Grujčić D, Marinković D, Arsenijević S, Banković S. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Hum Reprod.* 2003;18(2):433-6.
227. Tomanin R, Ballarin C, Nardini B, Mastrangelo G, Sarto F. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis* 1991;6:123-6.
228. Schneider M, Diemer K, Engelhart K, Zankl H, Trommer WE, Biesalski HK. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res.* 2001;34(3):209-19.
229. Kopjar N, Kasuba V, Milić M, Rozgaj R, Zeljezić D, Gajski G i sur. [Normal and cut-off values of the cytokinesis-block micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes in the Croatian general population]. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2010 Jun;61(2):219-34.[croatian]
230. Weller E.M. UV-B-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes. *Int J Radiat Biol.* 1996;69(3):371-84.
231. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res.* 2001;475(1-2):57-67.

11. ŽIVOTOPIS

Ana Vičić rođena je 22. listopada 1982. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Brinju, dok je prirodoslovno-matematičku gimnaziju završila 2000. godine u Zagrebu. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 2006. godine i stekla titulu diplomiranog inženjera biologije - smjer molekularna biologija. Od 2007. godine zaposlena je u Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničke bolnice „Sveti Duh“.

U srpnju 2017. godine izabrana je u naslovno zvanje asistenta na Katedri za biologiju i fiziku Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu, gdje sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Molekularna biologija.

Autor je ili koautor devet znanstvenih radova indeksiranih u međunarodnim bazama.

Aktivno je sudjelovala na više međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova.

Član je Europskog udruženja citogenetičara (ECA), Hrvatskog društva za humanu genetiku (HDHG) te je tajnica Hrvatskog društva biologa u zdravstvu (HDBUZ).

Aktivno govori engleski jezik te pasivno poznaje njemački jezik.

12.PRILOZI

PRILOG 1. *Anketni upitnik za majke*

ANKETA ZA ISPITANIK (MAJKE)

1. OPĆI UPITNIK
2. ŽIVOTNE NAVIKE (PREHRANA, KONZUMACIJA ALKOHOLA, PUŠENJE, OPOJNA SREDSTVA)
3. IZLOŽENOST OKOLIŠNIM ČIMBENICIMA

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak anketiranja: Ana Vičić, dipl.ing.biol.

Ime i prezime voditelja istraživanja: izv.prof.dr.sc. Feodora Stipoljev

Broj ankete:

Mjesto i datum ispunjavanja ankete: _____

1. OPĆI UPITNIK

1.1. SOCIODEMOGRAFSKI PODACI		
1. Mjesto rođenja (grad, država):		
2. Koliko imate godina?		
3. Mjesto stanovanja:		
4. Koliko dugo živite u trenutnom mjestu stanovanja? (broj godina)		
5. Ako u trenutnom mjestu stanovanja živite manje od 10 godina, u sljedećoj tablici navedite gdje ste prije živjeli i koliko dugo (počevši od zadnjeg mjesta stanovanja)?		
Grad, država	Od (godina)	Do (godina)
6. U kojem predjelu grada živite?		
1 Predgrađe		
2 Industrijska zona		
3 Stambeno naselje		
4 Seosko naselje		
5 Ne znam/ ne želim odgovoriti		
7. Kakvo je Vaše bračno stanje?		
1 Udana ili stalni životni partner		
2 Neudana		
3 Razvedena ili rastavljena		
4 Udovica		
5 Drugo (navedite) _____		
6 Ne znam/ ne želim odgovoriti		
8. Koja je Vaša razina obrazovanja?		
1 Bez školovanja ili nezavršena osnovna škola		
2 Osnovna škola		
3 Srednja škola		
4 Viša ili visoka škola		
5 Fakultet		
6 Drugo (navedite) _____		

1.2. REPRODUKTIVNA POVIJEST**1. Koliko ste do sada imali trudnoća?****2. Ishod prethodnih trudnoća**

Broj trudnoće	Pobačaj: 1) Spontani 2) Inducirani	Datum rođenja djeteta ili kraja trudnoće	Novorođenče: 1) Živo 2) Mrtvo	Trajanje trudnoće (tjedni)	Spol djeteta: 1) Muško 2) Žensko 3) Nepoznat	Težina djeteta (u gramima)	Način poroda: 1) Vaginalno 2) Carskim rezom 3) Vakuum	Malformacije djeteta 1) Da 2) Ne	Da li je dijete živo? 1) Da 2) Ne
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

Ako je odgovor na pitanje **Malformacije djeteta „Da“**, molimo navedite malformacije (u slučaju više djece, navedite broj trudnoće i malformacije):

Ako je odgovor na pitanje **Da li je dijete živo „Ne“**, molimo navedite:

Dob djeteta _____, uzrok smrti _____

Dob djeteta _____, uzrok smrti _____

3. Da li Vam je u prethodnim trudnoćama bila dijagnosticirana neka od navedenih komplikacija?

	Broj trudnoće u kojoj je komplikacija dijagnosticirana									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a) Bez problema										
b) Hipertenzija										
c) Preeklampsija										
d) Eklampsija										
e) Gestacijski dijabetes										
f) Insuficijencija cerviksa										
g) Drugo (navedite) _____										

Objašnjenje pojmova:

Hipertenzija - visok krvni tlak u trudnoći; tlak viši od 140/90 mmHg

Preeklampsija - komplikacija u trudnoći koju karakteriziraju visok krvni tlak (hipertenzija), nalaz proteina u mokraći (proteinurija) te pojava edema (naticanje)

Eklampsija – pojava grčeva (konvulzija), vezanih na prethodno postojanje preeklampsije

Gestacijski dijabetes – šećerna bolest koja se pojavila u trudnoći

Insuficijencija cerviksa ili slabost vrata maternice – prijevremeno skraćivanje i otvaranje vrata maternice

4. Da li ste u nekoj od prethodnih trudnoća radili biokemijske testove probira (kombinirani probir, double ili triple test)?

1 Da

2 Ne

4a. Ako je odgovor „Da“, ispunite tablicu:

Broj trudnoće	Vrsta biokemijskog testa	Rezultat testa

5. Da li ste imali sljedećih reproduktivnih problema?

a) Teško ste zatrudnjeli **Da Ne**

b) Imali ste više spontanih pobačaja **Da Ne**

navedite koliko _____

c) Sterilitet (koristili ste postupak medicinski potpomognute oplodnje – IVF postupak)

Da Ne

navedite koji _____

1.3. MEDICINSKA ANAMNEZA

1. Da li je nekome od Vaših ukućana u posljednjih 6 mjeseci dijagnosticirana neka zarazna bolest (tuberkuloza, HIV infekcija, vodene kozice itd.)?

2 Da

3 Ne

1a. Ako je odgovor „Da“, u tablici navedite koja!

Vrsta bolesti	Osoba kojoj je dijagnosticirana

2. Da li je netko od članova Vaše uže ili šire obitelji rođen sa:

a) Nasljednom ili kromosomskom bolešću **Da** **Ne** **Ne znam**
b) Urođenim malformacijama **Da** **Ne** **Ne znam**
c) Nekom drugom bolešću **Da** **Ne** **Ne znam**

2a. Ako je odgovor „Da“ u tablici navedite bolest.

Vrsta bolesti	Oboljeli član obitelji

3. Da li Vam je ikad dijagnosticirana neka od sljedećih bolesti?

Bolest			Dob kada je bolest dijagnosticirana
a. Dijabetes	Da	Ne	
b. Bolesti srca	Da	Ne	
c. Poremećaj zgrušavanja krvi	Da	Ne	
d. Bolesti bubrega	Da	Ne	
e. Poremećaj funkcije štitne žlijezde	Da	Ne	
f. Tuberkuloza	Da	Ne	
g. HIV infekcija	Da	Ne	
h. Anksioznost	Da	Ne	
i. Depresija	Da	Ne	
j. Bolesti mokraćnog sustava	Da	Ne	
k. Kronična upala debelog crijeva	Da	Ne	
l. Tumor organa spolnog sustava	Da	Ne	
m. Drugo (navedite) _____			

4. Da li Vam je ikad dijagnosticiran neki oblik karcinoma?

1 Da
2 Ne

4a. Ako je odgovor „Da“ molimo odgovorite na sljedeća pitanja:

a) O kojoj vrsti karcinoma se radilo? _____
b) Koje godine Vam je dijagnosticiran? _____
c) Koju vrstu liječenja ste primili? (npr. zračenje, kemoterapija, ako znate navedite lijekove koje ste primali) _____

5. Da li je Vašim roditeljima, majci ili ocu ikad dijagnosticiran neki oblik karcinoma?

1 Da
2 Ne

5a. Ako je odgovor „Da“ navedite koji oblik karcinoma? _____

6. Da li ste u posljednjih 10 godina bili na rendgenskom snimanju?

1 Da
2 Ne

6a. Ako je odgovor „Da“ ispunite sljedeću tablicu:

Broj snimanja	Godina snimanja	Dio tijela koji je sniman	Razlog snimanja

7. Da li ste bili na rendgenskom snimanju prije 18 godine života?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

8. Da li ste u posljednjih 10 godina bili na CT/CAT snimanju (kompjuterizirana tomografija)?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

8a. Ako je odgovor „**Da**“ ispunite sljedeću tablicu:

Broj snimanja	Godina snimanja	Dio tijela koji je sniman	Razlog snimanja

9. Da li ste bili na CT/CAT snimanju prije 18 godine života?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

10. Da li ste ikada primili transfuziju krvi?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

10a. Ako je odgovor „**Da**“, navedite godinu i razlog: _____

11. Da li Vi ili Vaše dijete patite od alergijskih bolesti kao što su:

	VI		DIJETE (navedite broj djece)
Alergijska astma	Da	Ne	
Atopijski dermatitis	Da	Ne	
Ekcem	Da	Ne	
Visoka temperatura	Da	Ne	
Drugo, navedite _____	Da	Ne	

12. Da li ste u posljednjih godinu dana uzimali ili uzimate neke lijekove? (Uključujući i biljne lijekove, kortikosteroidne kreme. NE NAVODITI vitamine i minerale.)

- 1 Da
- 2 Ne

12a. Ako je odgovor „**Da**“, ispunite sljedeću tablicu.

Naziv lijeka	Razlog uzimanja (bolest)	Razdoblje uzimanja	Uzimana lijeka	doza
13. Da li ste u posljednjih godinu dana bili cijepljeni? 1 Da 2 Ne 13a. Ako je odgovor „ Da “, navedite cjepivo: _____				

2. ŽIVOTNE NAVIKE

(PREHRANA, KONZUMACIJA ALKOHOLA, PUŠENJE, OPOJNA SREDSTVA)

2.1. PREHRANA

1. Da li ste vegetarijanac?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Bila sam

2. Da li proizvodite hranu kod kuće? (Uključujući meso, povrće, voće, kruh, žitarice)

- 1 Da
- 2 Ne

2a. Ako je odgovor „Da“, navedite količinu i vrstu hrane:

3. Da li jedete biološki, ekološki ili organski uzgojenu hranu?

- 1 Da
- 2 Ne

3a. Ako je odgovor „Da“, zaokružite koliko često:

- 1 Nikada do jednom mjesečno
- 2 1-3 puta mjesečno
- 3 Jednom tjedno
- 4 Nekoliko puta tjedno
- 5 Svakodnevno

3b. Koliki postotak Vaše prehrane je iz ekološkog uzgoja?

- 1 Voće i povrće ___%
- 2 Kruh ___%
- 3 Meso ___%
- 4 Jaja ___%
- 5 Mlijeko i mliječni proizvodi ___%
- 6 Riža i tjestenina ___%

4. Koliko obroka povrća ili jela s povrćem jedete tjedno (ne misli se na krumpir)?

5. Koliko obroka voća ili jela s voćem jedete tjedno?

6. Koliko obroka crvenog mesa ili jela s crvenim mesom prosječno jedete tjedno, npr. teletina, janjetina, svinjetina? (ukoliko ne jedete crveno meso napisati 0)

7. Koliko obroka bijelog mesa ili jela s bijelim mesom prosječno jedete tjedno, npr. piletina, puretina ili druga perad? (ukoliko ne jedete bijelo meso napisati 0)

8. Koliko obroka ribe ili jela s ribom prosječno jedete tjedno?

9. Koliko puta tjedno konzumirate hranu iz konzervi? (misli se na paštete, konzervirano voće ili povrće itd.) _____

10. Da li ste posljednjih godinu dana uzimali neke od navedenih vitamina, minerala, Omega 3 ili drugih dodataka prehrani? Da Ne

10a. Ako **da**, zaokružiti koji preparat:

- a) Vitamin C
- b) Multivitamini s mineralima (navesti koji)_____
- c) Omega 3
- d) Vitamini B kompleksa
- e) Željezo
- f) Vitamin B12
- g) Kalcij/Magnezij
- h) Selen
- i) Folna kiselina
- j) Preparat češnjaka
- k) Beta gluklan
- l) Antioksidansi (Cink)
- m) Multivitamini bez minerala
- n) Drugi pojedinačni vitamini ili minerali (navesti koji)_____

2.2. KONZUMACIJA ALKOHOLA, PUŠENJE, OPOJNA SREDSTVA

1. Da li konzumirate alkohol?

- 1 Da
- 2 Ne

1a. Ako je odgovor „**Da**“, zaokružite koliko često:

- a) 6-7 puta tjedno
- b) 4-5 puta tjedno
- c) 2-3 puta tjedno
- d) Jednom tjedno
- e) 1-3 puta mjesečno
- f) Manje od jednom mjesečno

2. (Ako pijete alkohol) Koliko jedinica alkohola obično konzumirate (jedna jedinica je približno jedna čaša vina, 3 dl piva, jedno žestoko piće)?

- a) 10 ili više jedinica
- b) 7-9 jedinica
- c) 5-6 jedinica
- d) 3-4 jedinica
- e) 1-2 jedinica
- f) Manje od 1 jedinice

3. Da li trenutno pušite?

- 1 Da
- 2 Ne

3a. Ako je odgovor „**Da**“, koliko cigareta dnevno? _____

4. Da li ste ikada pušili? (misli se na barem 1 cigaretu dnevno tijekom barem godine dana)

- 1 Da
- 2 Ne

4a. Ako je odgovor „**Da**“, koliko ste dnevno cigareta pušili i koliko dugo? _____

5. Ako ste prestali pušiti, koliko ste imali godina kada ste prestali s pušenjem? _____

6. Da li netko od Vaših ukućana puši?
 1 Da
 2 Ne

6a. Ako je odgovor „Da“, ispunite sljedeću tablicu:

Navedite osobu	Koliko dnevno cigareta puši?	Koliko dnevno cigareta puši kod kuće?

7. Koliko ste pušenju izloženi na poslu?
 1 Jako puno
 2 Puno
 3 Malo
 4 Nimalo
 5 Ne radim

8. Da li ste ikada koristili opojna sredstva?
 1 Da
 2 Ne

8a. Ako je odgovor „Da“, navedite koje i koliko dugo?

3. IZLOŽENOST OKOLIŠNIM ČIMBENICIMA

3.1. IZLOŽENOST NA POSLU

1. Vaše trenutno radno stanje?

- a. Zaposlena
- b. Nezaposlena
- c. Student
- d. Kućanica
- e. Drugo (navedite) _____

2. (Ako ne radite) Da li ste bili zaposleni u posljednjih 10 godina?

- 1 Da
- 2 Ne

3. Da li na poslu dižete teške predmete (predmete teže od 10 kg)?

- 1 Da
- 2 Ne

3a. Ako je odgovor „Da“, koliko često?

- a) Ponekad (ne svaki dan)
- b) Često (svaki dan, nekoliko puta)
- c) Vrlo često (svaki dan, puno puta)

4. Da li ste na sadašnjem ili nekom od prošlih poslova (u posljednjih 10 godina) bili izloženi sljedećim kemikalijama? (Ako je odgovor „da“, opišite izloženost i razdoblje izloženosti)

	Odgovor	Vrsta posla i učestalost	Razdoblje izloženosti
a. Otapalo/ljepilo/adhezivna sredstva (npr. boje, sredstva za čišćenje, industrija obuće ili odjeće, drvna industrija, kozmetička ili farmaceutska industrija, kemijska čistionica, laboratoriji)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
b. Benzen (npr. kemijska industrija, laboratoriji, benzinske postaje)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
c. Olovo (npr. boje, glazura za keramiku, automobilska industrija, proizvodnja baterija, zavarivanje)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
d. Nikal (npr. metalurgija, kemijska industrija)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
e. Živa (npr. amalgamske plombe, proizvodnja baterija, obrada kože, izrada fotografija)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.

f. Kadmij (npr. automobilska industrija, industrija kože, proizvodnja stakla, tiskarska tinta)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
g. Arsen (npr. prerada zlata, cinka, bakra, olova, industrija stakla, proizvodnja pesticida)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
h. Sredstva za suzbijanje štetočina (npr. pesticidi, insekticidi)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
i. Formaldehid	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
j. Dušikov oksid (npr. uređivanje kupaonica)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
k. Etilen oksid (npr. uređivanje kupaonica)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
5. Da li ste na sadašnjem ili nekom od prošlih poslova (u posljednjih 10 godina) bili izloženi sljedećim situacijama? (Ako je odgovor „da“, opišite izloženost i razdoblje izloženosti)			
	Odgovor	Vrsta posla i učestalost	Razdoblje izloženosti
a. Vrlo visoka razina buke (onemogućuje komunikaciju s drugom osobom)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
b. Rukovanje strojevima koji proizvode vibracije	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
c. Ekstremne temperature ili vlažnost	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
d. Elektromagnetsko polje ili neionizirajuće zračenje (npr. telekomunikacije, UV zračenje, laser)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
e. Ionizirajuće zračenje (npr. rendgensko zračenje, α-zrake, β-čestice)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan)	Odgod. Dogod.

		2 Često (>2h/dan)	
f. Zarazni agensi ili biološko onečišćenje (npr. zdravstvene ustanove, laboratoriji, rad sa životinjama, klaonice)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.

3.2. IZLOŽENOST U KUĆI			
1. Koliko Vam na ljestvici od 1 do 10 smeta atmosfersko onečišćenje u Vašem domu - kada otvorite prozor (misli se na plinove, dim, prašinu itd. uzrokovane prometom, industrijom itd.)? _____			
2. Koliko Vam na ljestvici od 1 do 10 smeta buka u Vašem domu - kada otvorite prozor (misli se na buku od prometa, industrije itd.)? _____			
3. Koji su izvori buke najčešće prisutni u Vašem domu (možete zaokružiti više) i s kojim intenzitetom?			
	Intenzitet buke (zaokružite)		
	Jako	Srednje	Slabo
a. Djeca u kući	1	2	3
b. Ljudi na ulici	1	2	3
c. Ulični promet	1	2	3
d. Susjedi	1	2	3
e. Kafići, disko klubovi	1	2	3
f. Tvornice	1	2	3
g. Cestovni ili građevinski radovi	1	2	3
h. Drugo, navedite _____	1	2	3
i. Nikakva buka			
4. Da li imate kućne ljubimce? 1 Da 2 Ne 4a. Ako je odgovor „Da“, navedite koje: _____			
5. Koju vrstu grijanja imate u domu? 1 Prirodni plin 2 Loživo ulje 3 Električna energija 4 Štednjak na drva ili ugljen 5 Drugo, navedite _____			
6. Da li imate centralno grijanje? 1 Da 2 Ne			
7. Da li imate klimatizacijski uređaj? 1 Da 2 Ne			
8. Da li koristite plastične posude prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici? 1 Da			

2 Ne			
8a. Ako je odgovor „Da“, koliko često?			
1 Nekoliko puta tjedno			
2 Nekoliko puta mjesečno			
3 Manje od jednom mjesečno			
9. Da li koristite mobitel?			
1 Da			
2 Ne			
10. Da li koristite sljedeća sredstva za čišćenje?			
a. Izbjeljivač	Da	Ne	Ne znam
b. Amonijak	Da	Ne	Ne znam
c. klorovodična kiselina (HCl)	Da	Ne	Ne znam
d. Odstranjivači mrlja	Da	Ne	Ne znam
e. Sredstva za poliranje namještaja	Da	Ne	Ne znam
f. Sredstvo za pranje stakala/prozora	Da	Ne	Ne znam
g. Sredstvo za čišćenje tepiha	Da	Ne	Ne znam
h. Sredstvo za pranje podova	Da	Ne	Ne znam
i. Sprej za čišćenje pećnice	Da	Ne	Ne znam
j. Osvježivače zraka	Da	Ne	Ne znam
k. Tekućinu za peglanje	Da	Ne	Ne znam
l. Parfimirana sredstva za čišćenje	Da	Ne	Ne znam
m. Univerzalna sredstva za čišćenje	Da	Ne	Ne znam
n. Sredstva protiv moljaca	Da	Ne	Ne znam
11. Da li koristite antibakterijska sredstva za čišćenje?			
1 Da			
2 Ne			
11a. Ako je odgovor „Da“, navedite koja: _____			
12. Da li koristite insekticide ili sredstva protiv komaraca, žohara, mravi?			
1 Da			
2 Ne			
12a. Ako je odgovor „Da“, zaokružite koja u sljedećoj tablici:			
	Koliko često	U dnevnoj sobi	U ostatku kuće
a. Insekticidni sprejevi	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3
b. Sredstva koja se uključe u struju (tablete, tekućine)	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3
c. Losioni protiv kukaca	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3
d. Drugo, navedite _____	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3

3.3. IZLOŽENOST VANJSKIM ČIMBENICIMA

1. Da li imate vrt ili terasu sa zelenilom?

- 1 Da
- 2 Ne

2. Da li u vrtu koristite pesticide (insekticide, herbicide, itd.)?

- 1 Da
- 2 Ne

2a. Ako je odgovor „Da“, navedite koje i koliko često:

3. Da li se Vaš dom nalazi blizu nekog staklenika ili poljoprivrednog zemljišta?

- 1 Da
- 2 Ne

4. Da li se Vaš dom nalazi blizu tvornice?

- 1 Da
- 2 Ne

4a. Ako je odgovor „Da“, navedite o kojoj vrsti tvornice se radi (npr. tekstilna industrija, prehrambena itd.): _____

3.4. OSTALO

1. Koliko čaša vode u prosjeku dnevno popijete?

- 1 Nijednu
- 2 1 čašu
- 3 2 čaše
- 4 3-4 čaše
- 5 5-6 čaša
- 6 Više od 6 čaša

2. Koji je najčešći izvor vode koju pijete kod kuće (zaokružite samo najčešći)?

- 1 Voda iz javnog vodovoda
- 2 Privatni izvor ili bunar
- 3 Voda iz boce
- 4 Drugo, navedite: _____

3. Koji je najčešći izvor vode koju koristite za kuhanje (zaokružite samo najčešći)?

- 1 Voda iz javnog vodovoda
- 2 Privatni izvor ili bunar
- 3 Voda iz boce
- 4 Drugo, navedite: _____

4. Koji je najčešći izvor vode koju pijete izvan kuće (zaokružite samo najčešći)?

- 1 Voda iz javnog vodovoda
- 2 Privatni izvor ili bunar
- 3 Voda iz boce
- 4 Drugo, navedite: _____

5. Da li pijete crni čaj?

- 1 Da
- 2 Ne

5a. Ako je odgovor „da“ koliko šalica dnevno?

6. Da li pijete kavu?

- 1 Da
- 2 Ne

6a. Ako je odgovor „da“ koliko šalica dnevno?

7. Da li bojite kosu?

- 1 Ne
- 2 Da, pramenovi
- 3 Da, boja za kosu

**ANKETA ZA ISPITANIK
(OČEVI)**

4. OPĆI UPITNIK
5. ŽIVOTNE NAVIKE (PREHRANA, KONZUMACIJA ALKOHOLA,
PUŠENJE, OPOJNA SREDSTVA)
6. IZLOŽENOST OKOLIŠNIM ČIMBENICIMA

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak anketiranja: Ana Vičić, dipl.ing.biol.

Ime i prezime voditelja istraživanja: izv.prof.dr.sc. Feodora Stipoljev

Broj ankete:

Mjesto i datum ispunjavanja ankete: _____

1. OPĆI UPITNIK

1.1. SOCIODEMOGRAFSKI PODACI

1. Mjesto rođenja (grad, država):

2. Koliko imate godina?

3. Mjesto stanovanja:

4. Koliko dugo živite u trenutnom mjestu stanovanja? (broj godina)

5. Ako u trenutnom mjestu stanovanja živite manje od 10 godina, u sljedećoj tablici navedite gdje ste prije živjeli i koliko dugo (počevši od zadnjeg mjesta stanovanja)?

Grad, država	Od (godina)	Do (godina)

6. U kojem predjelu grada živite?

- 1 Predgrađe
- 2 Industrijska zona
- 3 Stambeno naselje
- 4 Seosko naselje
- 5 Ne znam/ ne želim odgovoriti

7. Kakvo je Vaše bračno stanje?

- 1 Oženjen ili stalni životni partner
- 2 Neoženjen
- 3 Razveden ili rastavljen
- 4 Udovac
- 5 Drugo (navedite) _____
- 6 Ne znam/ ne želim odgovoriti

8. Koja je Vaša razina obrazovanja?

- 1 Bez školovanja ili nezavršena osnovna škola
- 2 Osnovna škola
- 3 Srednja škola
- 4 Viša ili visoka škola
- 5 Fakultet
- 6 Drugo (navedite) _____

1.3. MEDICINSKA ANAMNEZA

1. Da li je nekome od Vaših ukućana u posljednjih 6 mjeseci dijagnosticirana neka zarazna bolest (tuberkuloza, HIV infekcija, vodene kozice itd.)?

1 Da

2 Ne

1a. Ako je odgovor „**Da**“, u tablici navedite koja!

Vrsta bolesti	Osoba kojoj je dijagnosticirana

2. Da li je netko od članova Vaše uže ili šire obitelji rođen sa:

a) Nasljednom ili kromosomskom bolešću **Da** **Ne** **Ne znam**

b) Urođenim malformacijama **Da** **Ne** **Ne znam**

c) Nekom drugom bolešću **Da** **Ne** **Ne znam**

2a. Ako je odgovor „Da“ u tablici navedite bolest.

Vrsta bolesti	Oboljeli član obitelji

3. Da li Vam je ikad dijagnosticirana neka od sljedećih bolesti?

Bolest			Dob kada je bolest dijagnosticirana
a. Dijabetes	Da	Ne	
b. Bolesti srca	Da	Ne	
c. Poremećaj zgrušavanja krvi	Da	Ne	
d. Bolesti bubrega	Da	Ne	
e. Poremećaj funkcije štitne žlijezde	Da	Ne	
f. Tuberkuloza	Da	Ne	
g. HIV infekcija	Da	Ne	
h. Anksioznost	Da	Ne	
i. Depresija	Da	Ne	
j. Bolesti mokraćnog sustava	Da	Ne	
k. Kronična upala debelog crijeva	Da	Ne	
l. Tumor organa spolnog sustava	Da	Ne	
m. Drugo (navedite) _____			

4. Da li Vam je ikad dijagnosticiran neki oblik karcinoma?

1 Da

2 Ne

4a. Ako je odgovor „**Da**“ molimo odgovorite na sljedeća pitanja:

a) O kojoj vrsti karcinoma se radilo? _____

b) Koje godine Vam je dijagnosticiran? _____

c) Koju vrstu liječenja ste primili? (npr. zračenje, kemoterapija, ako znate navedite lijekove koje ste primali) _____

5. Da li je Vašim roditeljima, majci ili ocu ikad dijagnosticiran neki oblik karcinoma?

- 1 Da
- 2 Ne

5a. Ako je odgovor „Da“ navedite koji oblik karcinoma? _____

6. Da li ste u posljednjih 10 godina bili na rendgenskom snimanju?

- 1 Da
- 2 Ne

6a. Ako je odgovor „Da“ ispunite sljedeću tablicu:

Broj snimanja	Godina snimanja	Dio tijela koji je sniman	Razlog snimanja

7. Da li ste bili na rendgenskom snimanju prije 18 godine života?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

8. Da li ste u posljednjih 10 godina bili na CT/CAT snimanju (kompjuterizirana tomografija)?

- 4 Da
- 5 Ne
- 6 Ne znam

8a. Ako je odgovor „Da“ ispunite sljedeću tablicu:

Broj snimanja	Godina snimanja	Dio tijela koji je sniman	Razlog snimanja

9. Da li ste bili na CT/CAT snimanju prije 18 godine života?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

10. Da li ste ikada primili transfuziju krvi?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Ne znam

10a. Ako je odgovor „Da“, navedite godinu i razlog: _____

11. Da li patite od alergijskih bolesti kao što su:

	Da	Ne
Alergijska astma	Da	Ne
Atopijski dermatitis	Da	Ne
Ekcem	Da	Ne
Visoka temperatura	Da	Ne

Drugo, navedite _____	Da	Ne	
12. Da li ste u posljednjih godinu dana uzimali ili uzimate neke lijekove? (Uključujući i biljne lijekove, kortikosteroidne kreme. NE NAVODITI vitamine i minerale.) 1 Da 2 Ne 12a. Ako je odgovor „ Da “, ispunite sljedeću tablicu.			
Naziv lijeka	Razlog uzimanja (bolest)	Razdoblje uzimanja	Uzimana doza lijeka
13. Da li ste u posljednjih godinu dana bili cijepljeni? 1 Da 2 Ne 13a. Ako je odgovor „ Da “, navedite cjepivo: _____			

2. ŽIVOTNE NAVIKE

(PREHRANA, KONZUMACIJA ALKOHOLA, PUŠENJE, OPOJNA SREDSTVA)

2.1. PREHRANA

1. Da li ste vegetarijanac?

- 1 Da
- 2 Ne
- 3 Bila sam

2. Da li proizvodite hranu kod kuće? (Uključujući meso, povrće, voće, kruh, žitarice)

- 1 Da
- 2 Ne

2a. Ako je odgovor „Da“, navedite količinu i vrstu hrane:

3. Da li jedete biološki, ekološki ili organski uzgojenu hranu?

- 1 Da
- 2 Ne

3a. Ako je odgovor „Da“, zaokružite koliko često:

- 1 Nikada do jednom mjesečno
- 2 1-3 puta mjesečno
- 3 Jednom tjedno
- 4 Nekoliko puta tjedno
- 5 Svakodnevno

3b. Koliki postotak Vaše prehrane je iz ekološkog uzgoja?

- 1 Voće i povrće ____%
- 2 Kruh ____%
- 3 Meso ____%
- 4 Jaja ____%
- 5 Mlijeko i mliječni proizvodi ____%
- 6 Riža i tjestenina ____%

4. Koliko obroka povrća ili jela s povrćem jedete tjedno (ne misli se na krumpir)?

5. Koliko obroka voća ili jela s voćem jedete tjedno?

6. Koliko obroka crvenog mesa ili jela s crvenim mesom prosječno jedete tjedno, npr. teletina, janjetina, svinjetina? (ukoliko ne jedete crveno meso napisati 0)

7. Koliko obroka bijelog mesa ili jela s bijelim mesom prosječno jedete tjedno, npr. piletina, puretina ili druga perad? (ukoliko ne jedete bijelo meso napisati 0)

8. Koliko obroka ribe ili jela s ribom prosječno jedete tjedno?

<p>9. Koliko puta tjedno konzumirate hranu iz konzervi? (misli se na paštete, konzervirano voće ili povrće itd.)</p>
<p>10. Da li ste posljednjih godinu dana uzimali neke od navedenih vitamina, minerala, Omega 3 ili drugih dodataka prehrani? Da Ne</p> <p>10a. Ako da, zaokružiti koji preparat:</p> <p>a) Vitamin C</p> <p>b) Multivitamini s mineralima (navesti koji) _____</p> <p>c) Omega 3</p> <p>d) Vitamini B kompleksa</p> <p>e) Željezo</p> <p>f) Vitamin B12</p> <p>g) Kalcij/Magnezij</p> <p>h) Selen</p> <p>i) Folna kiselina</p> <p>j) Preparat češnjaka</p> <p>k) Beta glukan</p> <p>l) Antioksidansi (Cink)</p> <p>m) Multivitamini bez minerala</p> <p>n) Drugi pojedinačni vitamini ili minerali (navesti koji) _____</p>

2.2. KONZUMACIJA ALKOHOLA, PUŠENJE, OPOJNA SREDSTVA

<p>11. Da li konzumirate alkohol?</p> <p>1 Da</p> <p>2 Ne</p> <p>11a. Ako je odgovor „Da“, zaokružite koliko često:</p> <p>a) 6-7 puta tjedno</p> <p>b) 4-5 puta tjedno</p> <p>c) 2-3 puta tjedno</p> <p>d) Jednom tjedno</p> <p>e) 1-3 puta mjesečno</p> <p>f) Manje od jednom mjesečno</p>
<p>12. (Ako pijete alkohol) Koliko jedinica alkohola obično konzumirate (jedna jedinica je približno jedna čaša vina, 3 dl piva, jedno žestoko piće)?</p> <p>a) 10 ili više jedinica</p> <p>b) 7-9 jedinica</p> <p>c) 5-6 jedinica</p> <p>d) 3-4 jedinica</p> <p>e) 1-2 jedinica</p> <p>f) Manje od 1 jedinice</p>
<p>13. Da li trenutno pušite?</p> <p>1 Da</p> <p>2 Ne</p> <p>13a. Ako je odgovor „Da“, koliko cigareta dnevno? _____</p>
<p>14. Da li ste ikada pušili? (misli se na barem 1 cigaretu dnevno tijekom barem godine dana)</p> <p>1 Da</p>

<p>2 Ne</p> <p>14a. Ako je odgovor „Da“, koliko ste dnevno cigareta pušili i koliko dugo? _____</p>		
<p>15. Ako ste prestali pušiti, koliko ste imali godina kada ste prestali s pušenjem? _____</p>		
<p>16. Da li netko od Vaših ukućana puši?</p> <p>1 Da</p> <p>2 Ne</p> <p>16a. Ako je odgovor „Da“, ispunite sljedeću tablicu:</p>		
Navedite osobu	Koliko dnevno cigareta puši?	Koliko dnevno cigareta puši kod kuće?
<p>17. Koliko ste pušenju izloženi na poslu?</p> <p>1 Jako puno</p> <p>2 Puno</p> <p>3 Malo</p> <p>4 Nimalo</p> <p>5 Ne radim</p>		
<p>18. Da li ste ikada koristili opojna sredstva?</p> <p>1 Da</p> <p>2 Ne</p> <p>18a. Ako je odgovor „Da“, navedite koje i koliko dugo?</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>		

3. IZLOŽENOST OKOLIŠNIM ČIMBENICIMA

3.1. IZLOŽENOST NA POSLU

1. Vaše trenutno radno stanje?

- a. Zaposlen
- b. Nezaposlen
- c. Student
- d. Drugo (navedite) _____

2. (Ako ne radite) Da li ste bili zaposleni u posljednjih 10 godina?

- 1 Da
- 2 Ne

3. Da li na poslu dižete teške predmete (predmete teže od 10 kg)?

- 1 Da
- 2 Ne

3a. Ako je odgovor „Da“, koliko često?

- a) Ponekad (ne svaki dan)
- b) Često (svaki dan, nekoliko puta)
- c) Vrlo često (svaki dan, puno puta)

4. Da li ste na sadašnjem ili nekom od prošlih poslova (u posljednjih 10 godina) bili izloženi sljedećim kemikalijama? (Ako je odgovor „da“, opišite izloženost i razdoblje izloženosti)

	Odgovor	Vrsta posla i učestalost	Razdoblje izloženosti
a. Otopalo/ljepilo/adhezivna sredstva (npr. boje, sredstva za čišćenje, industrija obuće ili odjeće, drvena industrija, kozmetička ili farmaceutska industrija, kemijska čistionica, laboratoriji)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
b. Benzen (npr. kemijska industrija, laboratoriji, benzinske postaje)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
c. Olovo (npr. boje, glazura za keramiku, automobilska industrija, proizvodnja baterija, zavarivanje)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
d. Nikal (npr. metalurgija, kemijska industrija)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
e. Živa (npr. amalgamske plombe, proizvodnja baterija, obrada kože, izrada fotografija)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
f. Kadmij (npr. automobilska industrija, industrija kože, proizvodnja stakla, tiskarska tinta)	1 Da 2 Ne 3 Ne	Navedite posao: Navedite učestalost:	Odgod. Do

	znam	1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)god.
g. Arsen (npr. prerada zlata, cinka, bakra, olova, industrija stakla, proizvodnja pesticida)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
h. Sredstva za suzbijanje štetočina (npr. pesticidi, insekticidi)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
i. Formaldehid	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
j. Dušikov oksid (npr. uređivanje kupaonica)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
k. Etilen oksid (npr. uređivanje kupaonica)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.

5. Da li ste na sadašnjem ili nekom od prošlih poslova (u posljednjih 10 godina) bili izloženi sljedećim situacijama? (Ako je odgovor „da“, opišite izloženost i razdoblje izloženosti)

	Odgovor	Vrsta posla i učestalost	Razdoblje izloženosti
a. Vrlo visoka razina buke (onemogućuje komunikaciju s drugom osobom)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
b. Rukovanje strojevima koji proizvode vibracije	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
c. Ekstremne temperature ili vlažnost	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
d. Elektromagnetsko polje ili neionizirajuće zračenje (npr. telekomunikacije, UV zračenje, laser)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
e. Ionizirajuće zračenje (npr. rendgensko zračenje, α -zrake, β -čestice)	1 Da 2 Ne 3 Ne znam	Navedite posao: Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Odgod. Dogod.
f. Zarazni agensi ili biološko onečišćenje	1 Da 2 Ne	Navedite posao:	Odgod.

(npr. zdravstvene ustanove, laboratoriji, rad sa životinjama, klaonice)	3 Ne znam	Navedite učestalost: 1 Ponekad (<2h/dan) 2 Često (>2h/dan)	Dogod.
---	-----------	--	--------------

3.2. IZLOŽENOST U KUĆI			
1. Koliko Vam na ljestvici od 1 do 10 smeta atmosfersko onečišćenje u Vašem domu - kada otvorite prozor (misli se na plinove, dim, prašinu itd. uzrokovane prometom, industrijom itd.)? _____			
2. Koliko Vam na ljestvici od 1 do 10 smeta buka u Vašem domu - kada otvorite prozor (misli se na buku od prometa, industrije itd.)? _____			
3. Koji su izvori buke najčešće prisutni u Vašem domu (možete zaokružiti više) i s kojim intenzitetom?			
	Intenzitet buke (zaokružite)		
	Jako	Srednje	Slabo
a. Djeca u kući	1	2	3
b. Ljudi na ulici	1	2	3
c. Ulični promet	1	2	3
d. Susjedi	1	2	3
e. Kafići, disko klubovi	1	2	3
f. Tvornice	1	2	3
g. Cestovni ili građevinski radovi	1	2	3
h. Drugo, navedite _____	1	2	3
i. Nikakva buka			
4. Da li imate kućne ljubimce? 1 Da 2 Ne 4a. Ako je odgovor „Da“, navedite koje: _____			
5. Koju vrstu grijanja imate u domu? 1 Prirodni plin 2 Loživo ulje 3 Električna energija 4 Štednjak na drva ili ugljen 5 Drugo, navedite _____			
6. Da li imate centralno grijanje? 1 Da 2 Ne			
7. Da li imate klimatizacijski uređaj? 1 Da 2 Ne			
8. Da li koristite plastične posude prilikom grijanja hrane u mikrovalnoj pećnici? 1 Da 2 Ne 8a. Ako je odgovor „Da“, koliko često? 1 Nekoliko puta tjedno 2 Nekoliko puta mjesečno 3 Manje od jednom mjesečno			

9. Da li koristite mobilni telefon?			
1 Da			
2 Ne			
10. Da li koristite sljedeća sredstva za čišćenje?			
a. Izbjeljivač	Da	Ne	Ne znam
b. Amonijak	Da	Ne	Ne znam
c. klorovodična kiselina (HCl)	Da	Ne	Ne znam
d. Odstranjivači mrlja	Da	Ne	Ne znam
e. Sredstva za poliranje namještaja	Da	Ne	Ne znam
f. Sredstvo za pranje stakala/prozora	Da	Ne	Ne znam
g. Sredstvo za čišćenje tepiha	Da	Ne	Ne znam
h. Sredstvo za pranje podova	Da	Ne	Ne znam
i. Sprej za čišćenje pećnice	Da	Ne	Ne znam
j. Osvježivače zraka	Da	Ne	Ne znam
k. Tekućinu za peglanje	Da	Ne	Ne znam
l. Parfimirana sredstva za čišćenje	Da	Ne	Ne znam
m. Univerzalna sredstva za čišćenje	Da	Ne	Ne znam
n. Sredstva protiv moljaca	Da	Ne	Ne znam
11. Da li koristite antibakterijska sredstva za čišćenje?			
1 Da			
2 Ne			
11a. Ako je odgovor „Da“, navedite koja: _____			
12. Da li koristite insekticide ili sredstva protiv komaraca, žohara, mravi?			
1 Da			
2 Ne			
12a. Ako je odgovor „Da“, zaokružite koja u sljedećoj tablici:			
	Koliko često	U dnevnoj sobi	U ostatku kuće
a. Insekticidni sprejevi	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3
b. Sredstva koja se uključe u struju (tablete, tekućine)	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3
c. Losioni protiv kukaca	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3
d. Drugo, navedite _____	1 cijele godine	1	1
	2 sezonski	2	2
	3 rijetko	3	3

3.3. IZLOŽENOST VANJSKIM ČIMBENICIMA

1. Da li imate vrt ili terasu sa zelenilom?

1 Da

2 Ne

<p>2. Da li u vrtu koristite pesticide (insekticide, herbicide, itd.)?</p> <p>1 Da 2 Ne</p> <p>3a. Ako je odgovor „Da“, navedite koje i koliko često:</p> <p>_____</p>
<p>3. Da li se Vaš dom nalazi blizu nekog staklenika ili poljoprivrednog zemljišta?</p> <p>1 Da 2 Ne</p>
<p>4. Da li se Vaš dom nalazi blizu tvornice?</p> <p>1 Da 2 Ne</p> <p>4a. Ako je odgovor „Da“, navedite o kojoj vrsti tvornice se radi (npr. tekstilna industrija, prehrambena itd.): _____</p>

<p>3.4. OSTALO</p>
<p>1. Koliko čaša vode u prosjeku dnevno popijete?</p> <p>1 Nijednu 2 21 čašu 3 32 čaše 4 3-4 čaše 5 5-6 čaša 6 Više od 6 čaša</p>
<p>2. Koji je najčešći izvor vode koju pijete <u>kod kuće</u> (zaokružite samo najčešći)?</p> <p>1 Voda iz javnog vodovoda 2 Privatni izvor ili bunar 3 Voda iz boce 4 Drugo, navedite: _____</p>
<p>3. Koji je najčešći izvor vode koju koristite <u>za kuhanje</u> (zaokružite samo najčešći)?</p> <p>1 Voda iz javnog vodovoda 2 Privatni izvor ili bunar 3 Voda iz boce 4 Drugo, navedite: _____</p>
<p>4. Koji je najčešći izvor vode koju pijete <u>izvan kuće</u> (zaokružite samo najčešći)?</p> <p>1 Voda iz javnog vodovoda 2 Privatni izvor ili bunar 3 Voda iz boce 4 Drugo, navedite: _____</p>
<p>5. Da li pijete crni čaj?</p> <p>1 Da 2 Ne</p> <p>5a. Ako je odgovor „da“ koliko šalica dnevno?</p>
<p>6. Da li pijete kavu?</p> <p>1 Da 2 Ne</p> <p>6a. Ako je odgovor „da“ koliko šalica dnevno?</p>