

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dorotea Ninković

**Omjer S-adenozilmetionina i
S-adenozilhomocisteina i polimorfizmi
gena za S-adenozilhomocistein hidrolazu u
novorođenčadi s prirođenim srčanim
greškama i njihovih majki**

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dorotea Ninković

**Omjer S-adenozilmetionina i
S-adenozilhomocisteina i polimorfizmi
gena za S-adenozilhomocistein hidrolazu u
novorođenčadi s prirođenim srčanim
greškama i njihovih majki**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Autorica disertacije je Dorotea Ninković, dr. med., specijalist pedijatar - subspecijalist neonatologije u Zavodu za neonatologiju i neonatalno intenzivno liječenje Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i asistentica Katedre za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor disertacije je prof dr. sc. Ivo Barić, dr. med., specijalist pedijatar – subspecijalist genetike, pročelnik Zavoda za genetiku i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i redoviti profesor Katedre za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mjesto izvođenja istraživanja: Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Odjel za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Laboratorij za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

ZAHVALA

Hvala prof. dr. sc. Ivi Bariću, mom mentoru i jednom od učitelja pedijatrije.

Neizmjereno hvala prof. dr. sc. Kseniji Fumić, bez čije nesebične pomoći ove disertacije ne bi bilo.

Hvala Ivi Bilandžiji, Ivani Križić, Tariku Kapiću, Josipi Gulin i ostalim kolegicama iz Odjela za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Hvala dr. sc. Danijeli Petković Ramadži, prof. dr. sc. Ivanu Malčiću, dr. Dorotei Bartoniček, dr. Robertu Belužiću te dr. sc. Oliveru Vugreku.

Hvala magistri sestrinstva Mariji Džimbeg i višoj medicinskoj sestri Višnji Mihelčić.

Hvala mojim roditeljima, mojem suprugu i mojoj dječici na ljubavi i podršci kojom me svakodnevno blagoslivljaju.

Hvala mom Gospodinu na Milosti koju mi ne prestaje pružati.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

1.	UVOD.....	1
1.1.	Etiopatogeneza prirođenih srčanih grešaka.....	1
1.1.1.	Pojavnost prirođenih srčanih grešaka.....	1
1.1.2.	Razvoj srca.....	1
1.1.3.	Etiopatogenetska podjela prirođenih srčanih grešaka.....	4
1.2.	Čimbenici koji utječu na pojavnost srčanih grešaka	7
1.3.	Metabolizam metionina, homocisteina i folata.....	8
1.3.1.	Metionin.....	8
1.3.2.	S-adenozilmetionin.....	10
1.3.3.	S-adenozilhomocistein.....	11
1.3.4.	Metilacijski potencijal	13
1.3.5.	Povezanost ciklusa folata i remetilacije homocisteina.....	16
1.3.6.	Povezanost poremećaja u ciklusu folata, metionina i homocisteina i pojavnosti prirođenih malformacija ..	17
1.3.7.	Dosadašnje spoznaje o povezanosti prirođenih srčanih grešaka i poremećaja metilacije.....	18
1.4.	Povezanost prirođenih srčanih grešaka i enzima koji sudjeluju u metabolizmu folata.....	21
1.4.1.	Utjecaj polimorfizama gena za metiltetrahidrofolat reduktazu (<i>MTHFR</i>) na pojavnost prirodene srčane greške	21
1.4.2.	Utjecaj polimorfizama gena za betain homocistein metiltransferazu (<i>BHMT</i>) na pojavnost prirodene srčane greške.....	22
1.4.3.	Utjecaj polimorfizama gena za transkobalamin II (<i>TCII</i>) na pojavnost prirodene srčane greške.....	23
1.4.4.	Utjecaj polimorfizama gena za metionin sintetaza reduktaza (<i>MTRR</i>) na pojavnost prirodene srčane greške.....	24
1.5.	Povezanost srčanih grešaka i enzima koji sudjeluju u metabolizmu metionina i homocisteina.....	24
1.5.1.	Manjak adenzin kinaze	24
1.5.2.	Manjak i polimorfizmi S-adenozilhomocistein hidrolaze.....	25
1.5.2.1.	Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza	25

1.5.2.2. Gen <i>AHCY</i>	27
1.5.2.2.1. Građa gena <i>AHCY</i>	27
1.5.2.2.2. Polimorfizmi gena <i>AHCY</i>	28
1.5.2.2.3. Patogene mutacije gena <i>AHCY</i>	30
2. HIPOTEZA	33
3. CILJEVI RADA	34
4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE	35
4.1. Ispitanici	34
4.2. Materijali i metode	40
4.2.1. Prikupljanje podataka	40
4.2.2. Mjerenje S-adenozilmationina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandenskom spektrometrijom masa	40
4.2.2.1. Reagensi i sastav otopina	40
4.2.2.2. Oprema i pribor	41
4.2.2.3. Postupak pripreme uzoraka za analizu	42
4.2.2.3.1. Uzorkovanje krvi i priprema uzoraka za mjerenje S-adenozilmationina i S-adenozilhomocisteina.....	42
4.2.2.3.2. Izdvajanje S-adenozilmationina i S-adenozilhomocisteina putem SPE-kolona	42
4.2.2.4. Razdvajanje S-adenozilmationina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemske spektometrije masa	42
4.2.2.4.1. Priprema otapala i HPLC-uređaja	43
4.2.2.5. Referentne vrijednosti za S-adenozilhomocistein, S-adenozilmationin i metilacijski potencijal u našem laboratoriju	45
4.2.3. Određivanje polimorfizama gena <i>AHCY</i> (<i>SAHH-2</i> i <i>SAHH-3</i>).....	46
4.2.3.1. Izdvajanje genomske DNA	46
4.2.3.2. Sekvenciranje egzona 2, 3 i 4 gena <i>AHCY</i>	47
4.3. Statističke metode	49
5. REZULTATI	50
5.1. S-adenozilmationin, S-adenozilhomocistein i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u njihovih majki.....	50

5.1.1.	Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u plazmi novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u referentnoj skupini.....	50
5.1.2.	Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u plazmi majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u referentnoj skupini	57
5.1.3.	Međusobni odnos koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom	59
5.1.4.	Međusobni odnos koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom.....	62
5.1.5.	Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na dob ispitanika	63
5.1.6.	Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na spol ispitanika	69
5.1.7.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini u odnosu na mortalitet.....	71
5.1.8.	Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanim skupinama s obzirom na etiopatogenetsku podjelu prirodnih srčanih greški po Clarku.....	73
5.1.9.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na prethodne pobačaje.....	78
5.1.10.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na mrtvorodne.....	79
5.1.11.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na postojanje drugih potomaka s prirođenom srčanom greškom.....	80
5.1.12.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na postojanje spontanih pobačaja, mrtvorodenih i drugih potomaka s prirođenom srčanim greškom u njihovih majki.....	81
5.1.13.	Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom.....	81
5.1.14.	Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom.....	84
5.1.15.	Utjecaj primjene vitamina B ₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom	86

5.1.16.	Utjecaj primjene vitamina B ₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom....	89
5.2.	Polimorfizmi gena <i>AHCY</i> u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u njihovih majki.....	91
5.2.1.	Učestalost polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena <i>AHCY</i> u ispitivanim skupinama.....	91
5.2.2.	Utjecaj polimorfizma rs13043752 (112 C>T) gena <i>AHCY</i> na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u ispitivanim skupinama.....	92
5.2.3.	Dodatne mutacije otkrivene ispitivanjem polimorfizama gena <i>AHCY</i>	96
6.	RASPRAVA.....	97
6.1.	Poremećaj metilacije u majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama.....	98
6.1.1.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama u odnosu na referentnu skupinu.....	98
6.1.2.	Uzrokuju li smanjeni metilacijski potencijal i povišena koncentracija S-adenozilhomocisteina u majke pojavu prirodne srčane greške u potomaka?.....	100
6.2.	Poremećaj metilacije u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama.....	103
6.2.1.	Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama u odnosu na referentnu skupinu	103
6.2.2.	Potencijalna štetnost povišenih koncentracija S-adenozilmetionina u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama.....	108
6.3.	Čimbenici koji mogu utjecati na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala.....	110
6.3.1.	Utjecaj dobi na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala.....	110
6.3.2.	Utjecaj spola na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala.....	111
6.3.3.	Usporedba S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na mortalitet	112
6.3.4.	Postoji li razlika u koncentracijama S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i u njihovih majki između pojedinih skupina prirođenih srčanih grešaka prema etiopatogenetskoj podjeli prema Clarku.....	113
6.3.5.	Utjecaj drugih faktora u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom na koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala.....	115

6.3.6.	Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesječju trudnoće na koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i njihovih majki.....	116
6.3.7.	Utjecaj primjene vitamina B ₁₂ u prvom tromjesječju trudnoće na koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i njihovih majki.....	118
6.4.	Pouzdanost tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa za mjerenje koncentracija S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u plazmi	120
6.5.	Učestalost polimorfizama rs13043752 (112 C>T) i rs41301825 (377 G>A) gena <i>AHCY</i> u ispitivanim skupinama	121
7.	ZAKLJUČCI	123
8.	SADRŽAJ.....	126
9.	SUMMARY.....	128
10.	POPIS LITERATURE	130
11.	KRATKA BIOGRAFIJA	151
	PRILOG - Anketni list za istraživanje metilacijskih poremećaja u prirođenim srčanim grešakama.....	152

KRATICE

ADM	– adenzin deaminaza
AdoHcy	– S-adenozilhomocistein
AdoMet	– S-adenozilmetionin
ADK	– adenzin kinaza
ADP	– adenzin difosfat
AHCY	– gen koji kodira enzim S-adenozilhomocistein hidrolazu
AMP	– adenzin monofosfat
ASD	– atrijski septalni defekt
ATP	– adenzin trifosfat
BHMT	– betain-homocistein metiltransferaza
Cbl	– kobalamin
CBS	– cistationin β -sintetaza
CCAVC	– kompletni zajednički atrioventrikulski kanal
CTH	– cistation γ -liaza
DHF	– dihidrofolat
DHFR	– dihidrofolat reduktaza
DNA	– deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DORV	– dvostruki izlaz krvnih žila iz desne klijetke
DMG	– dimetilglicin
dTMP	– deoksitiamin monofosfat
dUMP	– deoksiuracil monofosfat
EDTA	– etilendiamintetraoctena kiselina
ESI	– ionizacija putem elektrospreja (engl. <i>electrospray ionization</i>)

GNMT	– glicin N-metiltransferaza
GSH	– glutation
GSSG	– oksidirani glutation
Hcy	– homocistein
HPLC	– tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (od engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IS	– interni standard
ICH	– Međunarodna konferencija za harmonizaciju (od engl. <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
I-TGA	– korigirana transpozicija velikih krvnih žila
LC-MS	– tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (od engl. <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
MAT	– metionin adenoziltransferaza
Met	– metionin
MI	– metilacijski indeks
MMA	– metilmalonska kiselina
MS	– tandemski spektrometar masa
MS	– metionin sintetaza
MT	– metiltransferaza
mtDNA	– mitohondrijska DNA
MTHF	– metiltetrahidrofolat
MTHFD1	– metiltetrahidrofolat dehidrogenaza 1
MTHFR	– metiltetrahidrofolat reduktaza
MTR	– metionin sintetaza

MTRR	– metionin sintetaza reduktaza
NAD	– nikotinamid adenin dinukleotid
PCR	– lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDA	– otvoreni duktus arteriozus
RFLP	– polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (od engl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	– ribonukleinska kiselina (od engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SAHH	– S-adenozilhomocistein hidrolaza
SHMT	– serin hidroksimetil transferaza
SNP	– polimorfizam jednog nukelotida (od engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPE	– (solid-phase extraction) kolone
TA IIB	– trikuspidalna atrezija tipa IIB
TAPVC	– potpuni poremećaj utoka plućnih vena
TCII	– trankobalamin II
TAC	– zajednički arterijski trunkus
tHcy	– ukupni homocistein
THF	– tetrahidrofolat
TRIS	– trihidroksimetilaminometan
TYMS	– timidilat sintetaze
UTR	– nekodirajuće regije RNA (od eng <i>untranslated region</i>)
VCC	– prirođena srčana greška
VSD	– ventrikulski septalni defekt
5-MTHF	– 5-metiltetrahidrofolat
5,10-MTHF	– 5,10-metilentetrahidrofolat

1. UVOD

1.1. ETIOPATOGENEZA PRIROĐENIH SRČANIH GREŠAKA

1.1.1. Pojavnost prirođenih srčanih grešaka

Svake se godine u svijetu rađa više od milijun djece s prirođenom srčanom greškom (1). Prirodna srčana greška je najčešća „major“ malformacija čija se prevalencija kreće u rasponu od 2 do 11,7 na 1000 živorođene djece (2,3,4). Prevalencija prirodne srčane greške u SAD-u iznosi 8 do 10 na 1000 novorođenčadi, dok u Hrvatskoj ista iznosi 7,2 na 1000 novorođenčadi (5). Iako se sve veći značaj pridaje prevenciji njihovog nastanka u vidu prekonceptijske primjene folne kiseline i izbjegavanja teratogena te njihovom prenatalnom otkrivanju putem fetalne ehokardiografije kako bi se optimiziralo postnatalno zbrinjavanje, prirodne srčane greške i dalje predstavljaju najčešći uzrok smrti u perinatalnom i neonatalnom razdoblju (6).

Prema vremenu nastanka prirodne srčane greške možemo svrstati u malformacije kao primarne srčane greške nastale u ranom razdoblju kardiovaskularne morfogeneze, deformacije koje se razvijaju već intrauterino nakon završene morfogeneze zbog hemodinamskih uvjeta ili disrupcije koje predstavljaju genski uvjetovane morfološke promjene koje postupno očituju svoju fenotipiju s rastom jedinke (7).

1.1.2. Razvoj srca

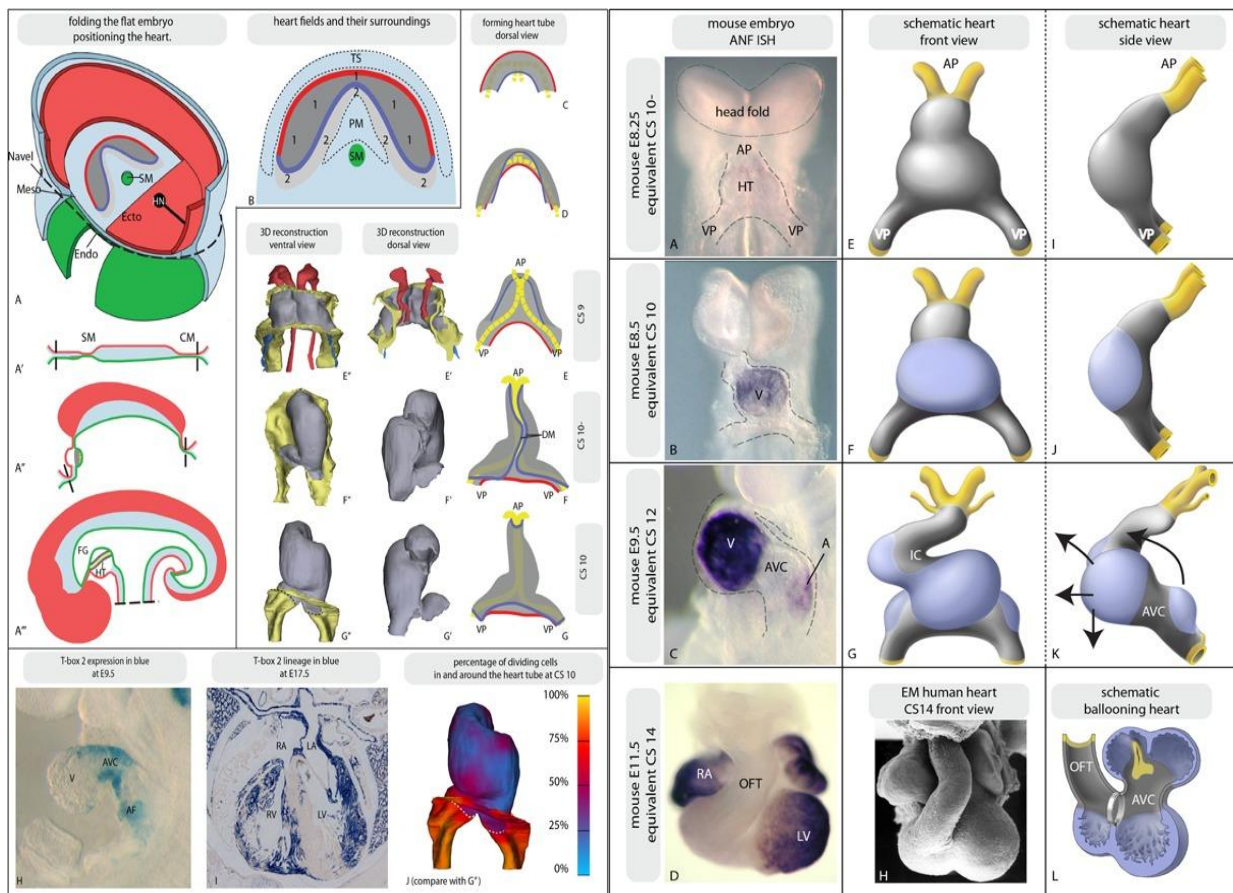
U cilju shvaćanja podjele srčanih grešaka, potrebno je imati spoznaju o osnovama razvoja srca. Naime, srce se razvija iz srčanih stanica, kardiomiocita, koje potječu iz antero-lateralnog mezoderma. U morfogenezi sudjeluju brojni molekularni čimbenici i transkripcijski faktori koji se aktiviraju ili suprimiraju vlastitu aktivnost u određenim fazama srčanog razvoja. Vaskularni sustav se počinje razvijati sredinom trećeg tjedna gestacije i njegov razvoj završava u desetom tjednu gestacije. U tablici 1 detaljno je opisan tijek razvoja srca zavisno od stadija razvoja ljudskog embrija (tzv. Carnegie stadiji).

Tablica 1. Tijek razvoja srca prema stadijima razvoja ljudskog embrija (preuzeto i neznatno modificirano iz literaturnog navoda br. 8)

Carnegie stadij	Postkonceptijski dani	Stadij srčanog razvitka
CS8	17-19	formiranje srčane petlje
CS9	19-21	početno presavijanje srčane petlje, formiranje perikardijalnih šupljina, endokardijalnog pleksusa i srčanog matriksa
CS10	22-23	srce ima otkucaje, endokardijalne cjevčice se spajaju, mezokardij se probija, započinje savijanje, klijetke se počinju oblikovati
CS11	23-26	atriji se oblikuju, formira se proepikardij
CS12	26-30	stvara se septum primum i desna venska valvula, stvara se muskularni dio ventikuskog septuma, počinje rast epikarda, nastaju stanice u srčanom matriksu
CS13	28-32	formiraju se atrioventrikularni (AV)-jastučići, plućne vene se usmjeravaju prema lijevoj pretklijetki, lijevi venski zalistak se formira, epikardijalni mezenhim se pojavljuje u AV-sulkusu
CS14	31-35	AV-jastučići se približavaju, grebeni izlaznog trakta postaju vidljivi, formiraju se kapilare u epikardijalnom mezenhimu
CS15	35-38	AV-jastučići se pozicioniraju jedan naprama drugom, formira se sekundarni foramen ovale, distalni izlazni trakt se razdvaja
CS16	37-42	primarni atrijski septum se zatvara, grebeni izlaznog trakta se približavaju intraventrikulskom septumu, cijelo srce je prekriveno epikardom
CS17	42-44	formira se sekundarni atrijski septum, sinusni čvor postaje vidljiv, lijevi i desni AV-spoj se razdvajaju, izdvaja se izlazni trakt desne klijetke, razvijaju se semilunarne valvule
CS18	44-48	formiraju se papilarni mišići, formiraju se AV-zalisci
CS19	48-51	lijeva venozna valvula se spaja sa sekundarnim septumom
CS21	53-54	stvaraju se glavne grane koronarnih arterija
CS22	54-56	formiraju se korde tendinee
CS23	56-60	kuspisi trikuspidalne valvule se delaminiraju

Srčane pristanice nalaze se u epiblastu, lateralno od primitivne pruge kroz koju one migriraju. Prve migriraju stanice iz kojih će se razviti izlazni dijelovi srca, dok će od stanica koje migriraju poslije nastati kaudalni dijelovi srca, desni ventrikul, lijevi ventrikul i sinus venosus. Tijekom razvoja, induktivnim djelovanjem endoderma te se stanice diferenciraju u mioblaste srčanog mišića. Otočiči tih stanica stvaraju kardiogeno područje, a iz embrionalne šupljine iznad njih razvija se perikardijalna šupljina. Srčana cijev u početku leži neposredno ispod mandibularnih nastavaka, zatim se polagano spušta u prsni koš i pomiče se ulijevo. Ovaj proces nastaje kao posljedica savijanja embrija kraniokaudalno i lateralno u oba smjera (slika 1).

Slika 1. Savijanje embrija i formiranje srčanih šupljina (preuzeto iz literaturnog navoda br. 8)



Time se dvije endotelne cjevčice u visceralnom mezodermu približe jedna drugoj i konačno se međusobno spoje u zajedničku srčanu cijev. Osnova srca ostaje jedinstvena proširena cijev. Prednji savijeni kraj potkovaste osnove proširi se u osnovu za budući izlazni (arterijski) kraj srca i srčane klijetke. Izlazni dio srca, srčani konus, razvija se u petom tjednu rastom dvaju

grebena postavljenih jedan nasuprot drugomu: desni gornji i lijevi donji trunkalni greben. Oba izrastaju jedan prema drugome i prema dolje te se postupno spajaju. Aktiviraju se endokardijalni jastučići stvarajući pregradu koja se razvija uz istovremenu rotaciju pulmonalne valvule oko aortalne, pa nastaje njihovo spiralno pregrađivanje. Glavne srčane pregrade nastaju između 27. i 37. dana razvoja. U srčanoj cijevi nastaju endokardijalni jastučići koji se razvijaju u atrioventrikularnom području, gdje sudjeluju u nastanku atrioventrikularnih ušća, membranskih dijelova interatrijske i interventrikularne pregrade te u konotrunkusnom području, gdje sudjeluju u oblikovanju ušća aorte i plućne arterije (8).

1.1.3. Etiopatogenetska podjela prirodnih srčanih grešaka

Na temelju navedenih spoznaja iz embriologije i genetike Clark je 1986. godine predložio etiopatogenetsku podjelu prirodnih srčanih grešaka (9), a 1996. godine objavio njezinu reviziju (10). Clarkova klasifikacija se zasniva na pretpostavci da relativno mali broj razvojnih mehanizama uzrokuje vrlo široki spektar fenotipski sličnih srčanih grešaka, koje pak zbog morfoloških razlika mogu imati različitu hemodinamiku. Na temelju Clarkove teorije prirodne srčane greške se dijele prema patogenetskom mehanizmu nastanka u šest skupina poremećaja (tablica 2).

Tablica 2. Patogenetički mehanizmi koji se prema Clarkovoj teoriji smatraju uzrocima anatomskih defekata (preuzeto i modificirano iz literaturnog navoda br. 9 i 10)

PATOGENI MEHANIZAM	MORFOLOŠKI POREMEĆAJ
1. POREMEĆAJI SMJEŠTAJA I FORMIRANJA SRČANE PETLJE	<ul style="list-style-type: none"> • Nepotpuna lateralizacija (heterotaksija) + atrijski izomerizam (dvostruka jednostranost) • Korigirana transpozicija velikih krvnih žila (l-TGA) • Horizontalno septirano srce (superior-inferior ventrikul)
2. POREMEĆAJ MIGRACIJE NEUROEKTODERMA U MEZENHIMNU OSNOVU ZA SRCE	<ul style="list-style-type: none"> • Zajednički arterijski trunkus (TAC) • Aortopulmonalni prozor • Pulmonalna atrezija s VSD-om • Tetralogija Fallot • Dvostruki izlaz krvnih žila iz desne klijetke (DORV)

<p>A) Poremećaji u septaciji konotrunkusa</p> <p>B) Abnormalnosti položaja konotrunkusnih jastučića</p>	<ul style="list-style-type: none"> • VSD subaortalni • Transpozicija velikih krvnih žila (d-TGA)- s VSD-om i anomalijama luka aorte
<p>C) Anomalije aortalnih (škržnih) lukova</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prekid luka aorte tip B • Dvostruki luk aorte • Desni luk aorte (zrcalna slika) • Abnormalna izlazišta arterija aortalnog luka
<p>3. POREMEĆAJI IZVANSTANIČNOG MATRIKSA-poremećaji endokardijalnih jastučića</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Kompletni zajednički AV-kanal (CCAVC) • Parcijalni AV-septumski defekt (ASD tip I) • VSD AV-kanala (inlet VSD ili tip III) • Displazija pulmonalne/aortne valvule
<p>4. POREMEĆAJI USMJERENOG RASTA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Potpuni anomalni utok pulmonalnih vena (TAPVC) • Parcijalni anomalni utok pulmonalnih vena + scimitar sindrom • Cor triatriatum sinistrum
<p>5. ABNORMALNOSTI APOPTOZE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Muskularni VSD • Ebsteinova anomalija trikuspidalne valvule
<p>6. POREMEĆAJI INTRAKARDIJALNOG PROTOKA KRVNI</p> <p>A) Poremećaji protoka u desnom srcu</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pulmonalna atrezija bez VSD-a • Pulmonalna stenoza bez VSD-a • Pulmonalna stenoza s VSD-om • Periferna pulmonalna stenoza
<p>B) Poremećaji protoka u lijevom srcu</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sindrom hipoplastičnog lijevog srca • Aortalna valvularna stenoza • Koarktacija i hipoplazija aortnog luka • Bikuspidna aortalna valvula
<p>C) Septalni poremećaji</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Perimembranozni VSD • ASD tip II
<p>D) Perzistirajući duktus arteriozus</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Perzistirajući duktus arteriozus Botallo

Ostatna skupina kardiovaskularnih poremećaja kojima etiopatogeneza do sada nije utvrđena obuhvaća:

- poremećaje ulaska u klijetku (*double inlet* ventricle, trikuspidna atrezija)
- anomalije *trabeculae septomarginalis* (dvostruka desna klijetka)
- desnostrane anomalije (anomalije trikuspidalne valvule, insuficijencija pulmonalne valvule)
- lijevostrane anomalije (anomalije mitralne valvule, aortalna insuficijencija, anomalije koronarnih arterija)
- anomalije velikih krvnih žila (perzistirajuća lijeva gornja šuplja vena, periferne anomalije krvnih žila)
- neoznačene srčane greške

Navedena klasifikacija bit će osnova za podjelu pacijenata i njihovih majki u skupine prilikom detaljne obrade podataka dobivenih ovim istraživanjem.

1.2. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA POJAVNOST SRČANIH GREŠAKA

Niti jedna prirođena srčana greška, neovisno o složenosti, nije poseban entitet, već je rezultat složene interakcije više ili manje poznatih embrioloških i genskih čimbenika, čimbenika okoline u perikonceptijskom razdoblju te majčinih životnih navika (6). Snažni dokazi upućuju da genetski čimbenici (kromosomske abnormalnosti, točkaste mutacije) izrazito utječu na pojavnost srčanih grešaka (11,12). Naime, prirođena srčana greška pojavljuje se u oko 95% bolesnika s trisomijom 18, oko 50% djece s Downovim sindromom te u oko 40% bolesnika s Turnerovim sindromom. Pojavljuju se i u određenih monogeniski nasljednih bolesti, kao u Noonanovom i Marfanovom sindromu, a mogu se pojaviti i u sklopu tzv. genomopatija u kojima je zahvaćena skupina gena čija promjena rezultira nastankom malformacijskog sindroma u sklopu kojega nalazimo i prirođenu srčanu grešku (npr. Williams-Beurenov sindrom, DiGeorgeov sindrom).

Čimbenici okoline u perikonceptijskom razdoblju te majčine životne navike također mogu biti značajan čimbenik u nastanku prirođenih srčanih grešaka. U prilog tome govori pojavnost srčane greške u djece s Downovim sindromom u kojih se usprkos sveprisutnoj trisomiji 21. kromosoma srčana greška javlja u 43 do 58% pacijenata (13). Jedan od mogućih mehanizama nastanka jest poremećaj u metilaciji kako majčine DNA, tako i DNA potomaka (14). Dokazano je da je, uz druge epigenetske mehanizme, poremećaj metilacije DNA povezan s pojavnošću različitih bolesti kao što su karcinomi (15,16), šećerna bolest (17,18), psihijatrijski poremećaji (19,20) i druge. Metilacija DNA, dodavanjem metilne skupine na peti atom ugljika u citozinu, može mijenjati strukturu molekule DNA rezultirajući modifikacijom ekspresije gena. Na taj način promijenjena metilacija postaje važan čimbenik u nastanku bolesti.

Mogući doprinos poremećaja u metilaciji u nastanku prirođenih srčanih grešaka počeo se istraživati proučavanjem metabolizma folata (21). Dokazano je da su manjak folne kiseline u perikonceptijskom razdoblju i posljedična majčina hiperhomocisteinemija čimbenici rizika za pojavu prirodene srčane greške (22-25). Perikonceptijska uporaba folne kiseline značajno smanjuje koncentraciju homocisteina u krvi i pojavnost prirođenih srčanih grešaka, dok primjena antagonista folata značajno povećava pojavnost istih (26,27). Pretpostavlja se da sam homocistein nema teratogeni učinak, već da je on posljedica nakupljanja prethodnika homocisteina u metabolizmu metionina.

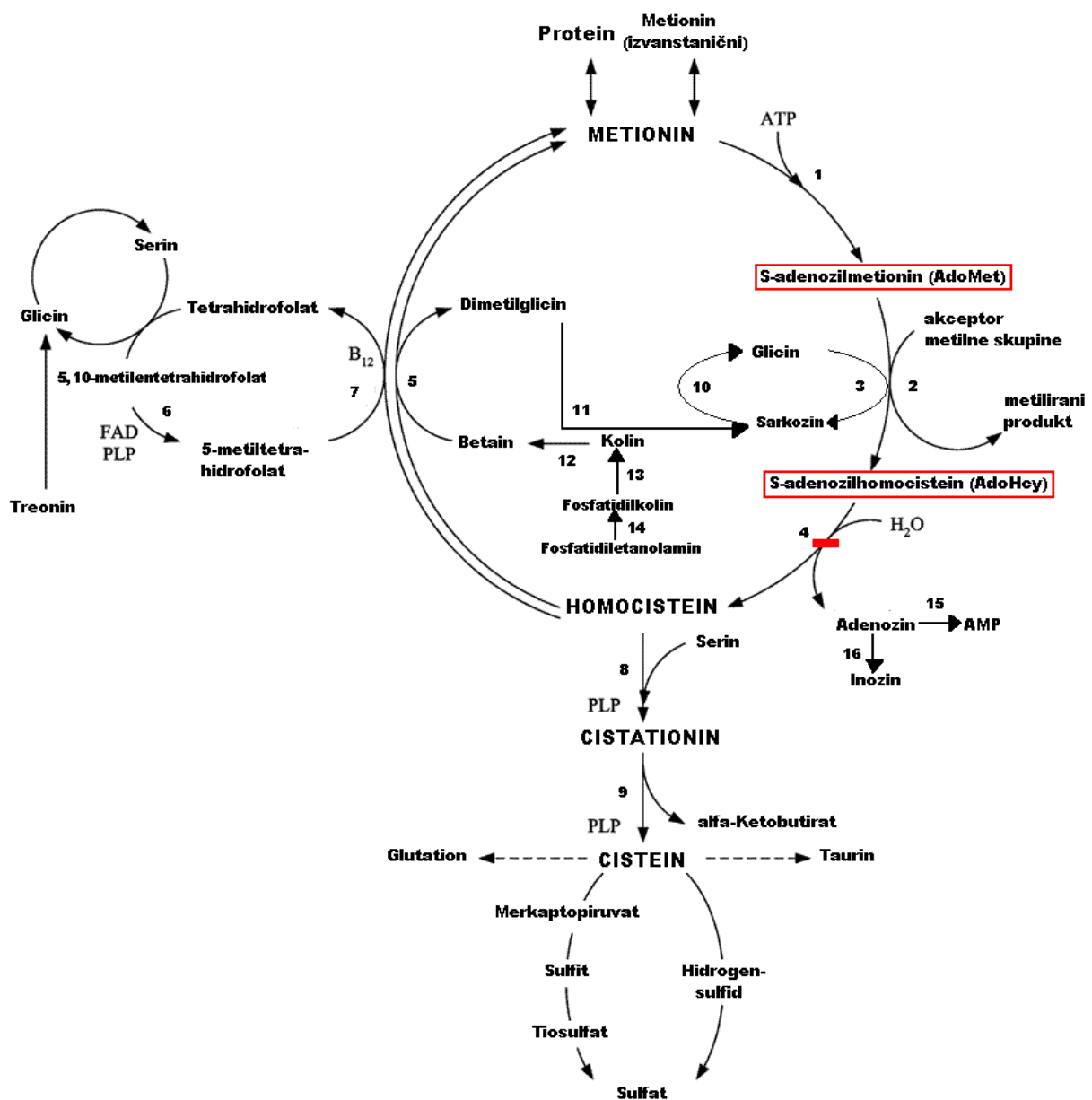
1.3. METABOLIZAM METIONINA, HOMOCISTEINA i FOLATA

Aminokiselina metionin (Met) te njezini spojevi obogaćeni ATP-om S-adenozilmetionin (AdoMet) i S-adenozilhomocistein (AdoHcy) zajedno s homocisteinom (Hcy) sudjeluju u procesima metilacije, remetilacije i transsulfuracije u stanici. Procesi metilacije i remetilacije služe za “davanje“ i “primanje” ugljika u metilnim skupinama (CH₃), dok se procesom transsulfuracije odstranjuje višak sumpora i stvaraju spojevi poput glutationa i taurina (slika 2).

1.3.1. Metionin

Metionin je esencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor. Sudjeluje u mnoštvu staničnih procesa od kojih je najvažnija izgradnja proteina. S njim započinju i dva stanična ciklusa: ciklus metionina i proces transsulfuracije. U ciklusu metionina on predstavlja izvor metilnih skupina za transmetilacijske procese u obliku ATP-om aktiviranog metionina, odnosno u obliku AdoMet-a, dok u ciklusu transsulfuracije dolazi do njegove degradacije i nastanka cisteina i cistina. Prvi korak oba ciklusa katalizira metionin adenziltransferaza (MAT) pri čemu nastaje AdoMet (28,29). Ciklus metionina je sveprisutan u ljudskom organizmu. Iako gotovo sve vrste stanica stvaraju AdoMet i koriste ga za sintezu proteina ili proces transmetilacije, jetra se izdvaja kao organ u kojem je koncentracija AdoMet-a najveća, kao i aktivnost MAT-a (30).

Slika 2. Metabolički putovi metionina i homocisteina (1=metionin adenziltransferaza, 2=AdoMet ovisne metiltransferaze, 3=glicin N-metiltransferaza, 4=S-adenozilhomocistein hidrolaza, 5=betainhomocistein metiltransferaza, 6=metiltetrahidrofolat reduktaza, 7=metiltetrahidrofolat metiltransferaza, 8=cistationin β sintaza, 9=cistationin γ liaza, 10=sarkozin dehidrogenaza, 11=N,N-dimetilglicin dehidrogenaza, 12=kolin dehidrogenaza, 13=fosfolipaza D, 14=fosfatidiletanolamin metiltransferaza, 15=adenozin kinaza, 16=adenozin deaminaza, FAD=flavin adenin dinukleotid, PLP=piridoksalfosfat)

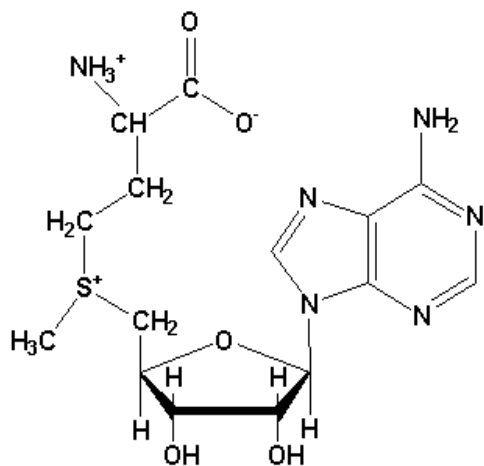


1.3.2. S-adenozilmetionin

S-adenozilmetionin (AdoMet, SAM, SAME) je gotovo sveprisutan spoj koji je još 1954. godine opisao Cantoni (31) (slika 3). Nalazimo ga u svim živim stanicama u kojima djeluje ne samo kao donor metilnih skupina, već i kao prekursor aminopropilnih skupina koje se koriste u sintezi poliamina važnih za rast stanice. Također je i prekursor glutationa, snažnog antioksidansa koji nastaje iz cisteina kroz proces transulfuracije (30). Nastaje iz metionina koji se nije ugradio u proteine i ATP-a, u reakciji posredovanoj AdoMet-sintetazom koju još nazivamo metionin adenoziltransferaza (MAT). MAT je kodiran s dva gena koji iskazuju specifičnu vezanost za određena tkiva. Tako gen *MAT1A* kodira enzim MAT I/III i eksprimiran je samo u jetri odraslog čovjeka, dok gen *MAT2A* kodira enzim MAT II prisutan u svim tkivima (32,33). AdoMet je glavni davatelj metilne skupine u organizmu. Reakcija se odvija putem brojnih metiltransferaza (MT). Katz i suradnici (34) su zaključili na temelju analize različitih genoma, uključujući humani, da AdoMet-ovisne metiltransferaze odgovaraju postotku od čak 0,6 do 1,6% otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frames*) u analiziranim genomima. Ova spoznaja upućuje na postojanje gotovo 300 AdoMet-ovisnih metiltransferaza u ljudi. Trenutačno se zna da je AdoMet univerzalni davatelj metilnih skupina za metiliranje otoka CpG, stvaranje kape i poli-A repa RNA, histone jezgre, topive proteine citoplazme, strukturne proteine membrane stanice, posttranslacijske modifikacije proteina, sintezu koenzima Q, vitamina K, vitamina E, karnitina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, melatonina, fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina, kreatina,...

AdoMet ima izrazito važnu ulogu u regulaciji metilacijskog ciklusa. Poremećaji metabolizma AdoMet-a imaju teške posljedice za život, diferencijaciju i funkciju stanica, prvenstveno jetre i središnjeg živčanog sustava (35-47). Dosadašnje spoznaje o AdoMet-u dovele su do njegove uporabe kao lijeka u različitim stanjima poput depresije, Parkinsonove bolesti, demencije, osteoartritisa, fibromijalgije, ciroze jetre uslijed alkoholizma i intrahepatične kolestaze, oštećenja jetre nakon terapije citostaticima, s tim da se njegova primjena istražuje i u drugim kroničnim i zloćudnim bolestima (48-52).

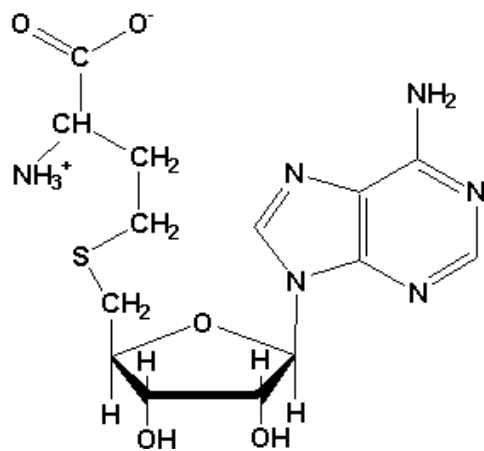
Slika 3. Kemijska formula S- adenzilmetionina (AdoMet-a)



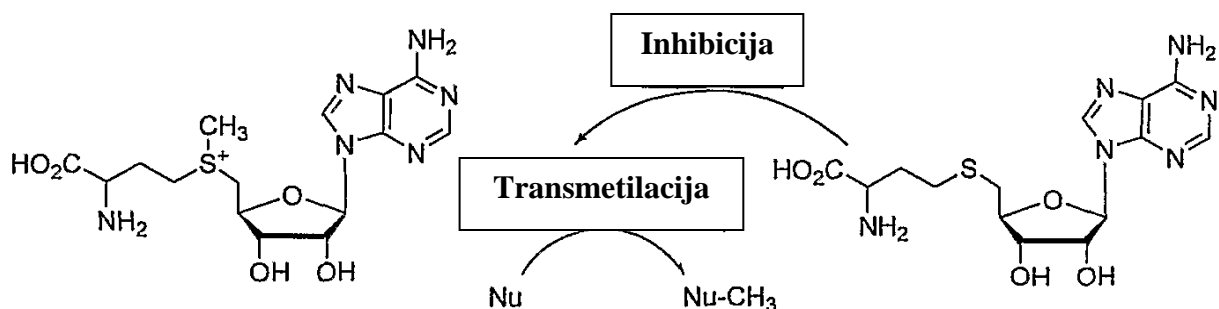
1.3.3. S-adenozilhomocistein

S-adenozilhomocistein (AdoHcy, SAH) je slobodni radikal nastao najvećim dijelom transmetilacijskim procesima posredovanim raznim metiltransferazama (MT), nakon prijenosa metilne skupine s AdoMet-a na brojne molekule - primatelje (slika 4, slika 5).

Slika 4. Kemijska formula S-adenozilhomocisteina (AdoHcy-a)



Slika 5. Nastanak S-adenozilhomocisteina (AdoHcy-a) iz S-adenozilmetionina (AdoMet-a)



No, nedostatak te jedne metilne skupine dovoljan je za potpuno oprečne biološke učinke AdoMet-a i AdoHcy-a. AdoHcy snažno inhibira sve reakcije u kojima nastaje, što ga čini potentnim inhibitorom svih metiltransferaza.

Odmah po nastanku, AdoHcy se hidrolizira i razgrađuje djelovanjem enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) na homocistein (Hcy) i adenzin (Ado). Enzimatska reakcija katalizirana SAHH-om je dvosmjerna i favorizira stvaranje AdoHcy-a u odnosu na stvaranje Hcy-a. Kako bi ona tekla u smjeru hidrolize AdoHcy-a i stvaranja Hcy-a (i onemogućilo se nakupljanje inhibitora AdoHcy-a u stanici), njezini produkti Hcy i Ado se moraju otplavljivati iz stanice. Hcy se odstranjuje remetilacijom ili transulfuracijom, a Ado fosforilacijom ili deaminacijom putem enzima adenzin deaminaze (ADM) koja pretvara adenzin u inozin.

Remetilacija Hcy-a u Met je katalizirana enzimom metionin sintetazom (MTR) (53) koja predstavlja poveznicu između metabolizma homocisteina i ciklusa folata (slika 2). MTR zahtijeva prisustvo kobalamina (Cbl) kao kofaktora i njihov spoj Cbl(I)MTR se veže za metilnu skupinu 5-metil tetrahidrofolata (THF) i stvara metilCbl(III)MTR. Nakon što se metilna skupina iz metilCbl(III)MTR iskoristi za pretvorbu homocisteina u metionin, MTR opet može prihvatiti novu metilnu skupinu iz 5-metilTHF. Oksidacijom kobalamina tj. Cbl(I) nastaje tzv. Cbl(II), forma koja rezultira neaktivnim kompleksom Cbl(II)MTR-a. Enzim metionin sintetaza reduktaza (MTRR) reaktivira taj kompleks reduktivnom metilacijom, koristeći AdoMet kao donor metilne

skupine (54). Uz ovaj enzimski sustav remetilacije koji je prisutan u svim stanicama, u jetri i bubrezima postoji još i enzim betain homocistein metiltransferaza (BHMT) kojim se homocistein metilira u metionin putem metilne skupine iz betaina (55).

Procesom transsulfuracije Hcy se nepovratno degradira u cistein (slika 1). Transsulfuracija se odvija putem cistation β -sintetaze (CBS) i cistation γ -liaze (CTH), enzima koji su ovisni o vitaminu B₆. CBS katalizira spajanje homocisteina i serina u cistationin, kojeg CTH hidrolizira u cistein i α -ketobutirat. CBS nalazimo u jetri, bubrezima, mišićima i ovariju te tijekom rane embriogeneze u živčanom i kardiovaskularnom sustavu (56). Cistein koji nastaje ovim reakcijama, osim što ima važnu ulogu u sintezi proteina, služi i kao prethodnik u nastanku glutaciona, snažnog antioksidansa.

Ako se AdoHcy ne razgradi i nerazgrađen izađe iz stanice, budući da nije vezan za proteine (za razliku od homocisteina) slobodno cirkulira plazmom. AdoHcy iz ekstracelularne tekućine uklanjaju uglavnom bubrezi, dok ostali organi, u normalnim uvjetima, u manjoj mjeri preuzimaju i metaboliziraju taj spoj. Za razliku od AdoHcy-a, Hcy iz plazme preuzima i metabolizira jetra (30). U jetri se putem niza do sad opisanih enzima (MAT I/III, CBS, CTH, BHMT) odvija degradacija prevelike količine Met-a i održava adekvatna koncentracija Hcy-a. Visoka koncentracija Met-a dovodi do povećanja AdoMet-a koji inhibira enzim metiltetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) i potiče aktivnost CBS-a (57) i degradaciju Hcy-a transsulfuracijom. Ukoliko je koncentracija Met-a u stanici niska, npr. tijekom gladovanja, niske koncentracije AdoMet-a neće inhibirati MTHFR niti aktivirati CBS te će doći do remetilacije Hcy-a u Met.

1.3.4. Metilacijski potencijal

Metilacijski potencijal (metilacijski indeks) stanice je omjer koncentracija spojeva AdoMet-a i AdoHcy-a. Tijek transmetilacijskih reakcija ovisi o metilacijskom potencijalu. Važan je pokazatelj metaboličke kontrole mnogih procesa u stanici, od ekspresije gena do sinteze raznih proteina. Što je viša koncentracija AdoHcy-a, niži je metilacijski potencijal stanice što dovodi do jače inhibicije transmetilacijskih reakcija posredovanih metiltransferazama ovisnim o AdoMet-u. Vrijednosti metilacijskog potencijala su različite zavisno o tipu stanice, stupnju rasta

i razvoja tkiva. 2001. godine Clark je objavio da je metilacijski potencijal blizu ili iznad 10 fiziološki za većinu stanica (58), dok istraživanje Hirsha i suradnika iz 2008. godine govori o vrijednosti od 8.8 ± 3.1 (59). Srednja vrijednost u plazmi je, u istraživanju Gellekinka i suradnika, iznosila 8,5. U istoj publikaciji učinjen je osvrt na srednje vrijednosti omjera AdoMet-a/AdoHcy-a u plazmi u ranije objavljenim publikacijama koje su iznosile od 2,7 do 8,5 (60). Najvjerojatnije su tako velike razlike dobivene u pojedinim istraživanjima rezultat različitih metoda koje su korištene za mjerenje navedenih metabolita. Prema našim preliminarnim mjerenjima metilacijskog potencijala u plazmi zdravih ispitanica (N=47) metodom tandemske spektrometrije masa, sa svrhom izrade referentnih vrijednosti koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a, omjer AdoMet-a/AdoHcy-a u plazmi je približno 5,7. U zdrave novorođenčadi (N=50) omjer AdoMet-a/AdoHcy-a u plazmi dobiven istom metodom iznosi približno 2,3.

Koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a znatno su više (čak do 10 puta) u punoj krvi u odnosu na plazmu (61,62). Koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u eritrocitima su 20, tj. 15 puta više nego u plazmi (63). U urinu su njihove koncentracije višestruko više nego u plazmi (AdoMet-a oko 100 puta, a AdoHcy-a oko 30 puta) zbog toga što se AdoMet i AdoHcy izlučuju bubrezima. Frakcijska ekskrecija AdoMet-a bubrezima je 93%, a AdoHcy-a 39%, što rezultira značajno višim omjerom AdoMet-a i AdoHcy-a u urinu nego u plazmi i punoj krvi (61).

Posljedice reduciranog metilacijskog potencijala su značajne i, doima se, tkivno specifične (64). Uključuju demijelinizaciju središnjeg živčanog sustava (65,66), reduciranu sintezu neurotransmitora (67), smanjenu kemotaksiju i fagocitozu makrofaga (68), promijenjen sastav membranskih fosfolipida (69) i poremećenu propusnost stanične membrane (70), promijenjenu ekspresiju gena (71,72), promijenjenu staničnu diferencijaciju (73,74), otežano sazrijevanje limfocita koje može voditi k imunosupresiji (75). Promjene u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala prisutne su u mnogim neurodegenerativnim bolestima kao što su demencija, depresija, Parkinsonova bolest (76,77). U osoba s artritismom i fibromijalgijom također je pronađen poremećen metilacijski potencijal (78,79). Poremećaj metilacije se opisuje i kod kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i jetrenih bolesti (48-52). Nedavno provedeno istraživanje Haoa i suradnika iz 2016. godine (80) donosi prosječni metilacijski potencijal u zdravih ispitanika te prosječni metilacijski potencijal u ispitanika koji boluju od različitih bolesti (tablica 3). Iz navedenog istraživanja vidljivo je da je u gotovo svim

bolesnim stanjima metilacijski potencijal statistički značajno niži od metilacijskog potencijala u zdravih osoba (prvenstveno na račun značajnog povećanja AdoHcy-a).

Povišena koncentracija AdoHcy-a također se smatra važnim čimbenikom patogeneze bolesti koja nastaje zbog nedostatne aktivnosti SAHH-a (38-45) i ADM-a (81).

Koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography* - HPLC), Yi i ostali su proveli studiju koja je pružila dokaze da umjereno povećanje ukupnog Hcy-a u plazmi visoko korelira s usporednim povećanjem koncentracije AdoHcy-a u plazmi, ali ne i koncentracije AdoMet-a (82). Također, povišena koncentracija AdoHcy-a u plazmi i limfocitima povezana je s hipometilacijom DNA. Ovi rezultati upućuju na mogućnost da povišena koncentracija AdoHcy-a u plazmi može biti indirektan pokazatelj povišenog intrastaničnog AdoHcy-a i time i poremećaja metilacije u stanice.

Tablica 3. Standardne devijacije i prosječne vrijednosti metilacijskog potencijala (MI) u zdravim osoba i različitih bolesti (preuzeto iz literaturnog navoda 80)

Skupina	Raspon vrijednosti MI u plazmi	Prosječna vrijednost MI u plazmi
Zdravi ispitanici	0,40–6,50	2,23
Bolesni ispitanici	0,07–5,67	0,87
Cerebrovaskularne bolesti	0,36–5,67	1,06
Parkinsonova bolest	0,08–1,86	0,75
Depresija	0,36–1,94	0,87
Dijabetes	0,11–3,86	0,86
Visoki srčani tlak	0,10–1,19	0,92
Srčana bolest	0,07–1,95	0,78
Upala	0,28–2,13	0,82
Bubrežni poremećaji	0,10–1,92	0,70
Jetreni poremećaji	0,22–2,50	0,89
Respiratorni poremećaji	0,13–1,49	0,79
Tumor jetre	0,13–4,98	1,56
Tumor pluća	0,06–5,42	0,68
Ostali tumori	0,10–5,42	0,81

1.3.5. Povezanost ciklusa folata i remetilacije homocisteina

5-metilTHF djeluje kao donor metilne skupine za remetilaciju homocisteina (83). Na THF, nakon što otpusti metilnu skupinu, može direktno djelovati enzim serin hidroksimetil transferaza (SHMT) i THF postaje 5,10-metilenTHF (slika 1). SHMT je enzim ovisan o vitaminu B₆, koji koristi serin kao donora skupine s jednim ugljikom (84). THF također može postupno

prijeći u formu 5,10-metilenTHF-a, s 10-formilTHF-om i 5,10-metenilTHF-om kao međupro-
duktima. Ta reakcija je katalizirana metiltetrafolat dehidrogenazom (MTHFD1), enzimom koji
posjeduje aktivnost formiltetrahydrofolat sintetaze, meteniltetrahydrofolat ciklohidrolaze i metilen
tetrahydrofolat dehidrogenaze (85). 10-formilTHF je donor ugljika u sintezi purina. 5,10-
metilenTHF služi kao kofaktor u pretvorbi dUMP-a u dTMP te nakon toga pod utjecajem enzima
timidilat sintetaze (TYMS) iz njega nastaje dihydrofolat (DHF). Pod utjecajem dihydrofolat
reduktaze (DHFR) DHF prelazi opet u THF. Budući da je potreban za sintezu dTMP-a, 5,10-
metilenTHF može također pod utjecajem metiltetrahydrofolat reduktaze (MTHFR), enzima
ovisnog o riboflavin, prijeći u 5-metilTHF. Funkcija enzima MTHFR-a izuzetno je značajna za
dostupnost 5-metilTHF-a za remetilaciju homocisteina. Iz svega navedenog vidljivo je i zašto u
slučaju nedostatnog unosa folata te vitamina B₂, B₆ i B₁₂ postoji opasnost od nedovoljne
raspoloživosti 5-metilTHF-a za remetilaciju homocisteina.

1.3.6. Povezanost poremećaja u ciklusu folata, metionina i homocisteina i pojavnosti prirodnih malformacija

Niža koncentracija folata u majčinom serumu povezuje se s povećanom učestalošću ranih
spontanih pobačaja i preeklampsije (86), rascjepa neuralne cijevi (87), rascjepa usne i nepca te
razvojnih anomalija ekstremiteta (87).

Još 1976. godine Smithells i ostali (88) dokazali su znatno nižu koncentraciju folata u
serumu žena koje su rodile djecu s rascjepom neuralne cijevi. Daljnja istraživanja (89,90,91)
pokazala su da perikonceptijska primjena folne kiseline u dozi od 0,4 mg do 4 mg dnevno
značajno smanjuje mogućnost pojave rascjepa neuralne cijevi u novorođenčeta. Primjena
antagonista folata dvostruko povećava pojavnost rascjepa neuralne cijevi, s tim da se učinak
antagonista folata može poništiti peroralnom primjenom visokih doza folne kiseline (26,27).
Dokazano je i da neadekvatna funkcija MTHFR-a (92), kao i neadekvatan unos folne kiseline,
dovode do smanjene raspoloživosti 5-metilTHF-a koja prije opisanim mehanizmima dovodi do
hipometilacije DNA (93) kao i proteinske hipometilacije (93) koje pak dovode do pojave
rascjepa neuralne cijevi.

Majke novorođenčadi s rascjepom neuralne cijevi imale su kao pokazatelj smanjene metilacije povećanu koncentraciju homocisteina (94). Pretpostavka da je homocistein ili neki od njegovih prethodnika u metabolizmu metionina imaju teratogeni čimbenik potvrđena je istraživanjem u ptičjih embrija koji su u 27% slučajeva nakon ubrizgavanja homocisteina razvili rascjep neuralne cijevi, dok su u 23% slučajeva imali ventrikulski septalni defekt (95).

Kao što je već napomenuto, manjak folne kiseline u perikonceptijskom razdoblju čimbenik je rizika i za pojavu prirođene srčane greške (22-25). Perikonceptijska uporaba folne kiseline značajno smanjuje koncentraciju homocisteina u krvi i pojavnost prirođenih srčanih grešaka (96).

Kao jedan od važnih čimbenika u patogenezi rascjepa neuralne cijevi spominje se i nedostatak vitamina B₁₂. Ray and Blom su uvidom u niz studija zaključili da postoji umjerena povezanost između manjka vitamina B₁₂ i razvoja rascjepa neuralne cijevi (97,98). Nedostatak vitamina B₁₂, kofaktora za metionin sintetazu (enzima koji sudjeluje u remetilaciji homocisteina u metionin), dovodi do povećanja koncentracije homocisteina u plazmi. Stoga se pretpostavlja da manjak vitamina B₁₂ u majke u perikonceptijskom razdoblju dovodi do veće pojavnosti srčane greške u potomaka.

1.3.7. Dosadašnje spoznaje o povezanosti prirođenih srčanih grešaka i poremećaja metilacije

Unazad dvadesetak godina provedeno je nekoliko studija koje povezuju pojavnost prirođenih srčanih grešaka s poremećajem metilacije. Prvu studiju proveli su Kapusta i suradnici 1999. godine (24) uspoređujući pojavnost hiperhomocisteinemije u plazmi u majki djece s prirođenom srčanom greškom 3 do 6 mjeseci nakon poroda, nakon gladovanja i 6 sati nakon peroralnog opterećenja metioninom, s pojavnosti hiperhomocisteinemije u plazmi žena reproduktivne dobi koje imaju zdrave potomke. Iako je istraživanje bilo provedeno na relativno malom uzorku (27 ispitanica), dokazana je statistički značajno veća pojavnost hiperhomocisteinemije u plazmi nakon gladovanja u odnosu na kontrolnu skupinu, tj. 46,2% ispitanica su imale hiperhomocisteinemiju u usporedbi s 14,3% žena iz kontrolne skupine.

Scalon i suradnici pokazali su da neadekvatan unos folne kiseline (manje od 0,25 mg dnevno) dovodi do većeg rizika od pojave transpozicije velikih krvnih žila (99). Nakon toga je provedeno istraživanje koje je pokazalo da su fetalne stanice iz amnijske tekućine trudnica koje su nosile plodove s prirođenom srčanom greškom u komparaciji s fetalnim stanicama amnijske tekućine iz zdravih trudnoća imale statistički značajnu veću koncentraciju unutarstaničnog homocisteina (100).

Hobbs i suradnici (101) proveli su veliku studiju koja je obuhvaćala majke djece s prirođenim srčanim greškama, s tim da vrijeme od završetka trudnoće (bilo porodom, bilo spontanom ili namjernim pobačajem) do uzimanja uzorka krvi majke nije bilo definirano. U studiju je bilo uključeno 224 majki djece koja su imala malformacije srčanog septuma, konotrunkalne malformacije te sindrom hipoplastičnog lijevog ili desnog srca. Iz studije su isključene majke djece koja su uz srčanu grešku imale i kromosomsku anomaliju, poznatu monogensku nasljednu bolest ili poznati sindrom. Studija je pokazala statistički značajno višu koncentraciju Hcy-a i AdoHcy-a u plazmi ispitanica te statistički značajno niže koncentracije Met-a u plazmi ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu. MI je bio statistički značajno niži u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu. Koncentracije AdoMet-a, Ado-a, folne kiseline i vitamina B₁₂ nisu se razlikovale.

Kasnije provedena studija Charlotte Hobbs i suradnika (102) ukazala je da u iste skupine ispitanica postoji i statistički značajno viša koncentracija oksidiranog glutationa te niže koncentracije reduciranog glutationa i vitamina B₆.

Naknadno je ista skupina autora pokušala utvrditi postoji li jače izražena povezanost određenih skupina prirođenih srčanih greška s poremećajem metilacije (23). Podijelili su ispitanice u pet kategorija (majke djece s konotrunkalnim malformacijama, septalnim defektima, opstruktivnim lijevostranim malformacijama, opstruktivnim desnostranim malformacijama i složenim srčanim greškama). Ispitanice su u svim kategorijama imale statistički značajno veću koncentraciju homocisteina u odnosu na kontrolnu skupinu. Majke djece sa septalnim defektima, obstruktivnim lijevostranim i obstruktivnim desnostranim malformacijama imale su nižu koncentraciju metionina u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedino su majke djece s opstruktivnim

desnostranim malformacijama imale nižu koncentraciju folne kiseline u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu.

Verkleij-Hagoort i suradnici su pokazali da je rizik pojavnosti srčane greške u djeteta tri puta veći u majki s visokom koncentracijom homocisteina u plazmi (iznad 14,3 $\mu\text{mol/L}$), s tim da se mogućnost pojavnosti proporcionalno povećava s povećanjem koncentracije homocisteina u plazmi (25). Majke s hiperhomocisteinemijom imale su statistički značajno niže koncentracije folne kiseline i vitamina B₁₂ u serumu, dok su njihova djeca s prirođenom srčanom greškom imala više koncentracije folne kiseline i vitamina B₁₂ u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu (25).

S druge strane, koncentracija homocisteina, folne kiseline i vitamina B₁₂ nisu se značajno razlikovali u djece sa složenim srčanim greškama i njihovih majki u odnosu na kontrolne skupine u istraživanju Galdieria i suradnika (103).

Poremećaji metilacije u djece sa složenim srčanim greškama do sad su proučavani u sklopu istraživanja Obermann-Borsta i suradnika (104) te Alsayeda i suradnika (105). Obermann-Borsta i suradnici pokazali su da su koncentracije AdoMet-a te folne kiseline u serumu i eritrocitima djece sa srčanim greškama statistički značajno više u odnosu na kontrole. Među svim ispitanicima djeca sa srčanim greškama u sklopu sindroma (uglavnom Downov sindrom) imala su najviše koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i folne kiseline u eritrocitima te najniži MI, što sugerira sveukupnu hipometilaciju u osoba koje boluju od Downova sindroma. U istraživanju Alsayeda i suradnika koje je obuhvaćalo metabolite u sustavu remetilacije putem BHMT-a (Hcy, cistationin, AdoMet, AdoHcy, MI, MMA, betain, kolin, DMG) djeca sa VCC imala su više koncentracije AdoMet-a, DMG-a i betaina u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije bilo razlike u MI. Majke djece s VCC-om su imale više koncentracije DMG-a i niže vrijednosti AdoHcy-a i omjera betain/DMG.

1.4. POVEZANOST SRČANIH GREŠAKA I ENZIMA KOJI SUDJELUJU U METABOLIZMU FOLATA

Polimorfizmi gena koji kodiraju važne enzime u metabolizmu folata mogu promijeniti aktivnost navedenih enzima te dovesti do poremećaja u metabolizmu folata. Opisani su polimorfizmi jednog nukleotida ("*single nucleotide polymorphism*"-SNP) u genu za MTHFR, BHMT i transkobalamin II (TCII) koji se povezuju s većom pojavnosću VCC.

1.4.1. Utjecaj polimorfizama gena za metiltetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*) na pojavnost prirodene srčane greške

Metiltetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji je izuzetno bitan poveznik ciklusa folata i ciklusa metionina. On je flavoprotein, enzim (EC 1.5.1.20) koji katalizira demetilaciju 5,10-MTHF-a u najzastupljeniji cirkulirajući oblik folata u krvi tj. 5-metilTHF. Adekvatna funkcija enzima MTHFR-a izuzetno je značajna za dostupnost 5-metilTHF-a za remetilaciju homocisteina (85).

Mutacije gena za metiltetrahidrofolat reduktazu su učestale i nalaze se u trećine svjetske populacije, s tim da imaju učinak na funkciju enzima u oko 10% populacije (106). Najčešći polimorfizam koji se opisuje je zamjena nukleotida citozina timinom na položaju 677 (677C>T) u egzonu 4, što uzrokuje zamjenu valina alaninom na položaju 226 i rezultira sintezom enzima s pojačanom osjetljivošću na temperaturu i sa sniženom ukupnom aktivnosti za 30-50% (107). Ukoliko je riječ o homozigotnoj mutaciji gena (677T>T) ukupna aktivnost enzima može biti snižena 70 do 80% te je često prisutna i hiperhomocisteinemija. U istom je genu opisana i druga mutacija u egzonu 7 u kojoj je adenin zamijenjen citozinom na položaju 1298 (1298A>C), što u MTHFR-u uzrokuje zamjenu glutaminske kiseline alaninom (108,109). Rezultat ove mutacije je, slično mutaciji 677C>T, smanjena aktivnost enzima MTHFR-a koja je više izražena u homozigota (aktivnost smanjena 15% do 32% u homozigota), ali za razliku od mutacije 677C>T enzim nije pojačano osjetljiv na temperaturu. U slučaju istodobne pojave oba polimorfizma smanjena aktivnost MTHFR-a je izraženija te je prisutna viša koncentracija Hcy-a u plazmi u odnosu na slučaj kad je prisutna samo jedna mutacija (npr. heterozigotne mutacije 1298A>C i 677C>T zajedno imaju sličan učinak kao homozigotna mutacija 677T>T) (110).

Opisana je povezanost mutacija gena *MTHFR* 677C>T i 677T>T u majki s većom pojavnnošću pobačaja (111), većim rizikom pojavnosti rascjepa neuralne cijevi u potomaka (90) te većim rizikom pojavnosti rascjepa usne i nepca u potomaka (112). Brojna istraživanja su pokazala da postoji i veća pojavnost složenih srčanih grešaka u potomaka (113-116), s tim da pojavnost postaje statistički značajno uvećana ukoliko postoje dodatni čimbenici okoline kao što je niska koncentracija folne kiseline u plazmi majke (117), povećan BMI (117) te ukoliko majke puše (118). Perikonceptijska primjena folne kiseline anulira rizik veće pojavnosti VCC u majki koje imaju navedene mutacije. Također su istraživala i pojavnost prirođenih srčanih grešaka u potomaka u prisustvu mutacija *MTHFR* u očeva; mutacija *MTHFR* 677T>T u očeva povezana je također s 1,5 do 2 puta većom pojavnnošću složene srčane greške u potomaka (119).

Ispitivana je i povezanost veće pojavnosti prirođenih srčanih grešaka u djece s mutacijom gena *MTHFR* 677T>T. Nekoliko studija pokazalo je oprečne rezultate - Junker i suradnici su pokazali dvostruko veću pojavnost navedene mutacije u djece s VCC u odnosu na zdravu populaciju (120), dok van Beynum i suradnici (117) te Sanches-Urbina i suradnici (121) nisu našli povezanost navedene mutacije i veće pojavnosti VCC.

Mutacija gena *MTHFR* 1298A>C, bilo u majki djece sa prirođenom srčanom greškom bilo u same djece, nije pokazala utjecaj na veću pojavnost VCC (122).

1.4.2. Utjecaj polimorfizama gena za betain homocistein metiltransferazu (*BHMT*) na pojavnost prirodene srčane greške

Jedan od dva načina remetiranja homocisteina u metionin u jetri i bubrezima je putem enzima betain homocistein metiltransferaze (*BHMT*; EC 2.1.1.5).

Mutacija gena *BHMT* 716G>A (poznata i kao 742G>A, rs3733890) je SNP u kojem je arginin zamijenjen glutaminom na položaju 239 (123). Brojne studije pokazale su da navedena mutacija nema učinak na povećanje koncentracije homocisteina u plazmi (124-126). Opisano je da je navedena mutacija u trudnih žena povezana s povećanim rizikom od abrupcije placente (127). Utjecaj mutacije gena *BHMT* 716G>A na embrionalni razvoj i pojavnost prirođenih malformacija je dosta kontroverzan - studije upućuju da postoji povećan rizik defekta neuralne

cijevi (128,129), ali smanjen rizik pojave rascjepa usne i nepca. Navedena mutacija je također povećana sa smanjenim rizikom od pojave Downovog sindroma u potomaka (130).

Mutacija gena *BHMT* 716G>A nije povezana s većom pojavnošću VCC (118) osim ukoliko je majčin BMI bio veći od 30 prije početka trudnoće; tada je rizik gotovo dvostruki (118).

1.4.3. Utjecaj polimorfizama gena za transkobalamin II (*TCII*) na pojavnost prirodene srčane greške

Vitamin B₁₂ se u cirkulaciji veže na transportne proteine haptorin i transkobalamin. Transkobalamin je neophodan za unošenje vitamina B₁₂ u stanicu (131).

Opisana su četiri SNP-a humanog gena *TCII*: 198M>T, 219I>L, 259P>R i 376S>L (132). Različiti polimorfizmi ovog gena dovode do promjena u vezivanju vitamina B₁₂ za transkobalamin te posljedično slabije raspoloživosti vitamina B₁₂ u stanici te povećanih koncentracija homocisteina u plazmi (133). Najčešće opisivani polimorfizam je zamjena gvanina s citozinom na položaju 775 (775G>C) što rezultira zamjenom prolina argininom u kodonu 259 (259P>R). U istraživanju Namoura i suradnika (134) u heterozigota 259P>R prisutne su statistički značajno više koncentracije homocisteina u odnosu na homozigote 259R and 259P, mada kasnije studije nisu potvrdile ova saznanja. Moguće je da alel koji kodira divlji tip, povećavajući dostupnost intracelularnog vitamina B₁₂, sudjeluje u smanjenju koncentracije homocisteina budući da je metilkobalamin (aktivni oblik vitamina B₁₂) koenzim metionin sintetaze, enzima koji metilira homocistein u metionin.

Opisana je značajna povezanost majčinog polimorfizma gena *TCII* 776C>G u s rascjepom neuralne cijevi u potomaka (135). Mutacija gena *TCII* 776C>G nije povezana s većom pojavnošću VCC (118) osim ukoliko je majka tijekom trudnoće pušila i/ili konzumirala alkohol; tada je rizik bio gotovo dvostruko veći (1,81 u slučaju pušenja, tj. 1,71 puta u slučaju konzumiranja alkohola) (118).

1.4.4. Utjecaj polimorfizama gena za reduktazu metionin sintetaze (*MTRR*) na pojavnost prirodene srčane greške

Reduktaza metionin sintetaze (*MTRR*) je enzim bitan za oporavak aktivnosti enzima metionin sintetaze (*MTR*). Tijekom remetilacije katalizirane *MTR*-om, metilna skupina 5- metilTHF se premješta na homocistein, a *Cbl(I)* se oksidira u *Cbl(II)*, koji inaktivira *MTR*. Katalizirajući metilaciju *Cbl(II)* koristeći *AdoMet* kao donor metilne skupine, *MTRR* obnavlja aktivnost *MTR*-a (136). Poznate su mutacije gena *MTRR* 66A>G (rs1801394) i 524C>T (rs1532268). Najčešća mutacija gena *MTRR* 66A>G se javlja u oko 30% populacije i rezultira zamjenom izoleucina s metioninom (*I22M*) te dovodi do smanjenog kapaciteta *MTRR*-a za vezivanje za kompleks *MTR*-kobalamin(*I*) te posljedično smanjene učinkovitosti *MTRR*-a u obnovi aktivnosti *MTR*-a (137,138). Rezultat je povećana koncentracija homocisteina u plazmi (139). Mutacija 524C>T dovodi do zamjene serina s leucinom (*S175L*) (138). Prisustvo mutacije *MTRR* 66A>G dovodi se u vezu s većom incidencijom pojavnosti rascjepa neuralne cijevi (140) i Downovog sindroma (141). Nije nađena veća pojavnost složenih srčanih grešaka u potomaka (142), osim u slučajevima kad u majke postoji niska koncentracija vitamina B_{12} u plazmi.

Objek mutacije gena *MTRR* (*MTRR* 66A>G i *MTRR* 524C>T) u djece povezane su s 1,5 puta većom pojavnošću *VCC* (143), a mogućnost nastanka *VCC* raste dvostruko ukoliko je dijete nositelj obje mutacije (66G>G/524C>T i 66A>G/524C>T).

1.5. POVEZANOST SRČANIH GREŠAKA I ENZIMA KOJI SUDJELUJU U METABOLIZMU METIONINA I HOMOCISTEINA

1.5.1. Manjak adenozin kinaze

Bolesnici koji boluju od drugih nasljednih poremećaja u ciklusu metionina i homocisteina mogu imati prirodenu srčanu grešku kao dio kliničke slike.

Adenozin kinaza (*ADK*; EC 2.7.1.20) je nukleotid kinaza koja katalizira fosforilaciju adenzina na poziciji 50 ATP-ovisnim putem kako bi nastao *AMP* (144). *Ado* nastaje zajedno s

Hcy-om u ciklusu metionina hidrolizom AdoHcy-a putem SAHH-a. Enzimatska reakcija katalizirana SAHH-om je dvosmjerna i favorizira stvaranje AdoHcy-a u odnosu na stvaranje Hcy. Kako bi ona tekla u smjeru hidrolize AdoHcy-a i stvaranja Hcy-a (i onemogućilo se nakupljanje inhibitora AdoHcy-a u stanici), njezini produkti Hcy i Ado se moraju otplavljivati iz stanice. Ado se odstranjuje fosforilacijom ili deaminacijom putem adenozin deaminaze (ADM) koja pretvara adenozin u inozin. Ukoliko postoji manjak adenozin kinaze, Ado se neće moći adekvatno odstranjivati fosforilacijom i posljedično će doći do nakupljanja AdoHcy-a (30).

Manjak adenozin kinaze prvi je put opisan 2011. godine (145) u šest osoba. Do danas je u literaturi opisano 19 bolesnika s manjkom ADK-a (145,146). Svi bolesnici su u plazmi imali visoke koncentracije Met-a, AdoMet-a i AdoHcy-a, ali normalne ili tek blago povišene koncentracije Hcy-a. U osoba s manjkom ADK-a nalazimo teško psihomotoričko zaostajanje, izbočeno čelo, epilepsiju (oko 70% bolesnika), makrocefalus, slabost mišića i hipotoniju, ponekad i zatajenje jetre, koagulopatiju i maligni jetreni tumor. U devet do sada opisanih osoba s manjkom ADK-a opisana je neka od prirodnih srčanih grešaka greška kao što su pulmonalna stenoza, atrijalni septalni defekt, ventrikulski septalni defekt, koarktacija aorte i perzistirajući duktus Botallo. Pojavnost prirodne srčane greške u 47% do sad prepoznatih osoba s manjkom ADK-a može se povezati s visokim koncentracijama AdoHcy-a u plazmi, no vjerojatno je da primarno visoke koncentracije adozina djeluju teratogeno (146).

1.5.2. Manjak i polimorfizmi S-adenozilhomocistein hidrolaze

1.5.2.1. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza

S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH, E.C. 3.3.1.1) je ubikvitarni i visoko konzervirani protein. Izražen je u svim stanicama, u citoplazmi i jezgri stanice. Kodiran je visoko konzerviranim genom *AHCY*, smještenim u području cen-q13.1., na kromosomu 20. Poznato je nekoliko polimorfizama ovog gena. Transkript odgovara jednoj podjedinici enzima, monomeru. Prema kvarternoj strukturi, funkcionalni enzim SAHH je homotetramer. Svaka od četiri podjedinice SAHH sastoji od 432 aminokiseline, molekularne mase oko 47,7 kDa (147). Svaka podjedinica veže po jednu molekulu NAD, spoja važnog za enzimsku aktivnost. Svaka podjedinica ima tri domene: 1) NAD-domena (središnji dio, aminokiseline: 193-346) - na koju se

veže kofaktor NAD^+ , 2) katalitička domena (N-terminalni dio, aminokiseline 1-190 i C-terminalni dio, aminokiseline 355-402) na koju se veže supstrat AdoHcy; 3) oligomerizacijska domena (C-terminalni dio, aminokiseline 403-431) (147,148). Struktura enzima, utvrđena kristalografijom, prikazana je na slici 6 (147). Enzim se posttranslacijski acetilira na lizinima (Lys401 i Lys408). Pretpostavlja se da ova modifikacija rezultira inhibicijom katalitičke aktivnosti enzima te na taj način utječe na metilacijom posredovane procese u stanici (148).

Slika 6. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza. SAHH je tetramer s centralnim veznim mjestima za kofaktor NAD^+ i perifernim katalitičkim domenama na koje se veže AdoHcy (preuzeto iz literaturnog navoda br. 147)



SAHH je jedini enzim koji sudjeluje u pretvorbi AdoHcy-a u homocistein i na taj način regulira količinu AdoHcy-a, snažnog inhibitora AdoMet-ovisnih transmetilacijskih reakcija (slika 2). Zbog toga ima jedinstvenu ulogu u regulaciji procesa metilacije u svim stanicama. Obavlja jedinstvenu ulogu hidrolize, odnosno razgradnje, AdoHcy-a na Ado i Hcy. Na taj način regulira omjer koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a. Fiziološki, reakcija teče u smjeru razgradnje

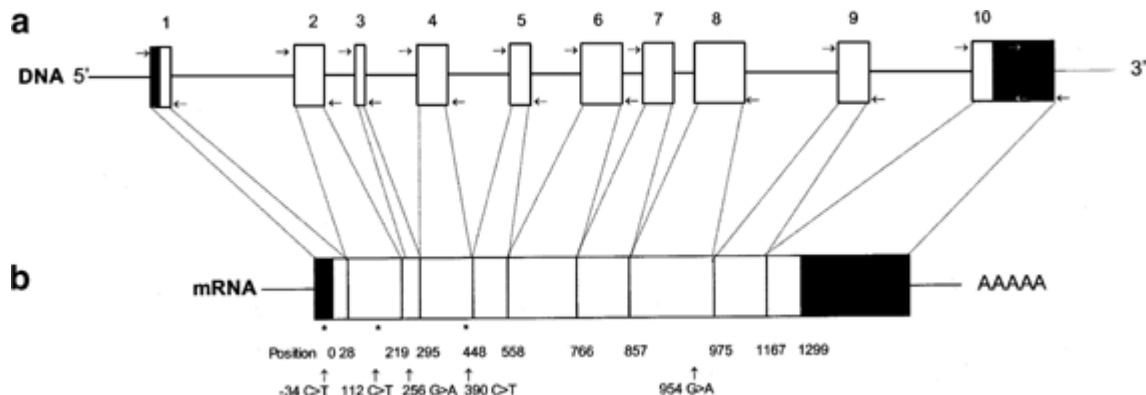
AdoHcy-a. Spojevi nastali razgradnjom AdoHcy-a se metaboliziraju - adenzin s adenzin kinazom i deaminazom, a homocistein s enzimima ciklusa transulfuracije ili remetilacije. Budući da je SAHH enzim koji može djelovati u dva smjera i da je termodinamski povoljniji sintetski put prema AdoHcy-u, sva stanja koja dovode do hiperhomocisteinemije mogu uzrokovati povećanje koncentracije AdoHcy-a i poremećaje metilacije (30). Kolika je biološka važnost enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze pokazuje i ispitivanje na miševima s homozigotnom delecijom gena *AHCY*, koji ugibaju u ranom embrionalnom razvoju (149) te biljkama s mutacijom gena *AHCY* koje se aberantno razvijaju (gušarka, lat. *Arabidopsis*) (150,151). Nedostatak aktivnosti SAHH-a u eksperimentalnim uvjetima uzrokuje poremećaj metilacije (152). Brojna su istraživanja pokazala da je patološki učinak povišene koncentracije homocisteina, uz oksidacijski stres zbog stvaranja radikala superoksid aniona i hidrogen peroksida, posljedica nakupljanja AdoHcy-a i/ili promjene metilacijskog potencijala te inhibicije transmetilacijskih reakcija (82). Kako se hiperhomocisteinemija povezuje s brojnim patološkim stanjima kao što su kardiovaskularne bolesti, tromboembolija, demencija (152), povećana učestalost ranih spontanih pobačaja i preeklampsije (86), rascjep neuralne cijevi (87), rascjep usne i nepca te razvojne anomalija ekstremiteta (87), neupitno je da je neometano odvijanje procesa metilacije u stanici preduvjet za normalno funkcioniranje cijelog organizma.

1.5.2.2. Gen *AHCY*

1.5.2.2.1. Građa gena *AHCY*

Gen *AHCY*, koji kodira protein SAHH, ima 11 egzona, dugačak je oko 23 kb i nalazi se na dugačkom kraku kromosoma 20 (20q13.1). Postoje dva različita transkripta ovog gena koji se međusobno razlikuju u N-terminalnom kraju (153). Prvi transkript (NM_000687.1 = ekson 1A) je široko eksprimiran, a nalazimo ga najviše u jetri i bubrezima. Ekson 1A kodira izoformu proteina koju čine 432 aminokiseline, molekularne mase 47,7 kDa. Drugi transkript (NM_001161766 = ekson 1B) je prisutan samo u testisima, a kodira protein koji čine 404 aminokiseline, molekularne mase 44,7 kDa (153). Navedeni gen je visoko konzerviran. Konzerviranost se očituje i na razini proteina; sličnost ovog enzima između čovjeka i kvasca veća je od 70% (153), što dodatno potvrđuje evolucijski konzerviranu ulogu enzima SAHH u stanicama eukariota. Shematski je gen *AHCY* prikazan na slici 7.

Slika 7. Shematski prikaz gena *AHCY*. Bijelo su označeni kodirajući dijelovi egzona (UTR, engl. *untranslated region*), crno nekodirajući dijelovi egzona (preuzeto iz literaturnog navoda br. 159)



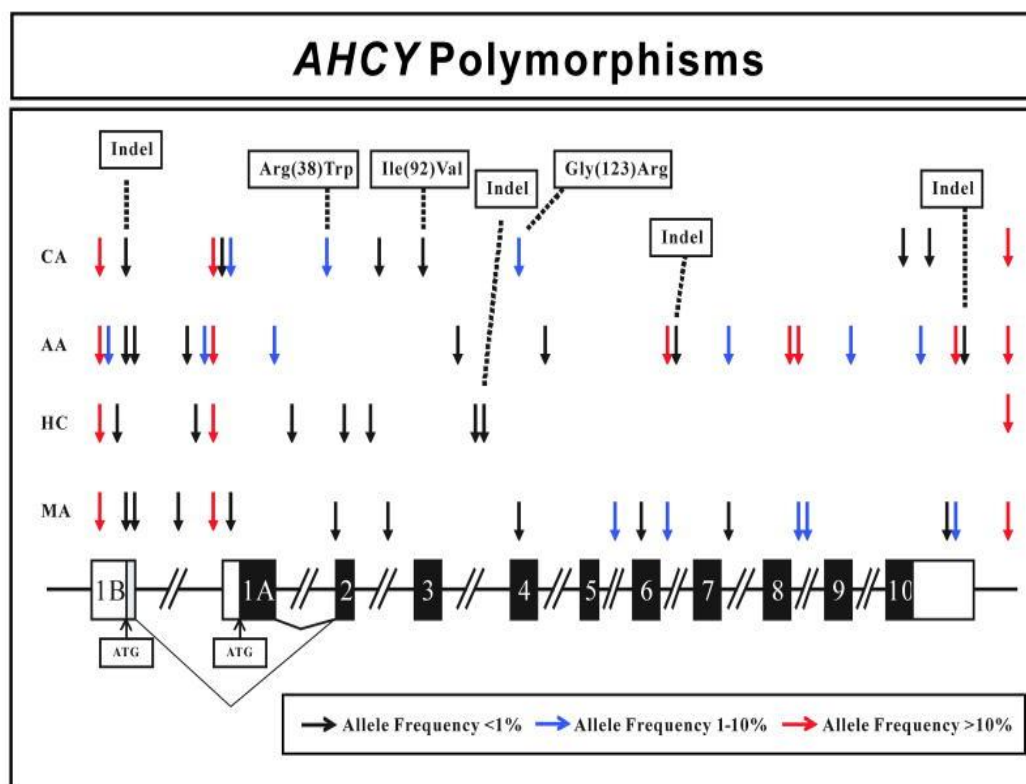
1.5.2.2.2. Polimorfizmi gena *AHCY*

Učestalost polimorfizama u genu *AHCY* ispitivana je u mnogim populacijama. Bissbort i suradnici su 1983. godine na populaciji jugozapadne Njemačke opisali dvije izoforme SAHH-a; SAHH-1 se javlja s učestalošću 96%, a SAHH-2 s učestalošću od 4% (154). Sličnu raspodjelu učestalosti navedenih izoformi utvrdili su i Akiyama i suradnici u populaciji Japana: učestalost SAHH-1 95,3% i učestalost SAHH-2 4,7% (155). Izoforma SAHH-3 je po prvi puta opisana u populaciji zapadne Njemačke 1985. godine, u istraživanju Scheil-a i suradnika gdje je učestalost SAHH-1 iznosila 97%, SAHH-2 2,5% i SAHH-3 0,5% (156). Slična pojavnost navedenih izoformi postoji i u populaciji Italije: SAHH-1 96,8%, SAHH-2 2,3% i SAHH-3 0,9% (157). Istraživačka skupina Kloor i suradnika pokazala je 2006. godine postojanje četiri inačice proteina SAHH u populaciji Hrvatske (158). Otkrivena su četiri različita proteina SAHH: SAHH-1, SAHH-2, SAHH-3 i SAHH-4, s tim da je varijanta SAHH-4 opisana po prvi put. SAHH-1 se javlja s učestalošću 94,1%, SAHH-2 3,2%, SAHH-3 0,6%, a SAHH-4 1,5%. Uz to, otkrivena je i izoforma SAHH*0 koja se pojavljuje s frekvencijom od 0,6%. Koncentracija SAHH*0 proteina odgovara približno 7,5% koncentracije divljeg tipa proteina. Pretpostavlja se da bi u našoj populaciji jedna od 30 000 osoba mogla biti homozigot za SAHH*0 (158).

U polimorfizmu SAHH-2 (rs13043752) koji su opisali Gellekink i suradnici u egzonu 2 dolazi do zamjene citozina u timin na položaju 112 (112C>T) te dolazi do zamjene aminokiseline arginin na položaju 38 triptofanom (p. 38R>W) (159). U polimorfizmu SAHH-3 (rs41301825), koji su također opisali Gellekink i suradnici, u egzonu 4 dolazi do zamjene gvanina adeninom na položaju 377 (377G>A) što rezultira zamjenom glicina u arginin na položaju 123 (p.123G>R) (159). Sekvenciranjem kodirajućeg područja gena *AHCY* nije nađeno promjena u osoba s proteinskom izoformom SAHH-4 opisanom od strane Fumić i suradnika pa se pretpostavilo da je ona nastala kao posljedica posttranslacijske modifikacije (160). Funkcijske analize izoformi SAHH-2 i SAHH-3 nisu pokazale smanjenje aktivnosti enzima u odnosu na divlji tip. I SAHH-2 i SAHH-3 imale su zadovoljavajuću katalitičku aktivnost i u smjeru sinteze i hidrolize AdoHcy-a ($\geq 94\%$). Međutim, dokazan je značajan utjecaj izoformi na termalnu stabilnost enzima. Prilikom 10-minutnog izlaganja izoforme SAHH-2 temperaturi od 50°C došlo je do 77% gubitka enzimske aktivnosti, a pri temperaturi višoj od 53°C nastala je potpuna inaktivacija proteina SAHH-2. Izoforma SAHH-3 je termalno stabilnija od izoforme SAHH-2 te 10-minutno izlaganje temperaturi od 50°C ne dovodi do gubitka enzimske aktivnosti. No, temperatura pri kojoj dolazi do razmotavanja proteina (engl. *unfolding*) nešto je niža u odnosu na divlji tip, za oko 1,5°C (160). Postoji mogućnost da termolabilnost navedenih izoformi u *in vivo* uvjetima mogu nepovoljno djelovati na aktivnost proteina i na taj način uzrokovati određeno patološko stanje.

Feng i suradnici su 2009. godine proveli veliko istraživanje učestalosti polimorfizama gena *AHCY* u pripadnika četiri etničke skupine populacije Sjedinjenih Američkih Država. Otkrili su ukupno 39 polimorfizama jednog nukleotida, uključujući i SAHH-2 i SAHH-3. Niti jedna od varijanti ne dovodi do značajno smanjenog izražaja proteina i enzimske aktivnosti u odnosu na divlji tip, osim inačica SAHH-2 i SAHH-3. Polimorfizmi SAHH-2 i SAHH-3 imaju blago sniženu enzimsku aktivnost: SAHH-2 za oko 25%, a SAHH-3 oko 20% (161).

Slika 8. Shematski prikaz gena *AHCY* i polimorfizma gena *AHCY*. Bijelo su označeni nekodirajući dijelovi gena (UTR, engl. *untranslated region*), a crno kodirajući dijelovi gena (preuzeto iz literaturnog navoda br. 161)



1.5.2.2.3. Patogene mutacije gena *ACHY*

2004. godine Barić i suradnici su po prvi put opisali nedostatnu aktivnost enzima SAHH koja nastaje kao posljedica patološke mutacije unutar gena *ACHY* (38). Do danas je u literaturi opisano deset osoba koje boluju od smanjene aktivnosti SAHH-a (38-44,162-164), od ukupno osam mutacija gena *ACHY*. Patogene mutacije 49R>C, 49R>H, 71G>S, 86D>G, 89A>V i 112W>STOP nalaze se u egzonima 2, 3 i 4 koji kodiraju katalitičku podjedinicu koja veže supstrat AdoHcy. Mutacija 143Y>C nalazi se u također u katalitičkoj podjedinici, a mutacija 328Y>D u podjedinici za koju se veže NAD⁺. Navedene mutacije značajno smanjuju enzimsku aktivnost proteina. Naime, aktivnost enzima u eritrocitima u većine bolesnika je značajno snižena, na između 5% i 20% u odnosu na kontrolne vrijednosti (38-40). Vugrek i suradnici su

detaljno proučili mutacije 112W>STOP, 143Y>C, 89A>V, 86D>G i 49R>C te dokazali da navedene mutacije dovode do značajnog gubitka enzimske aktivnosti u odnosu na divlji tip proteina (43,165,166). Opisane mutacije destabiliziraju strukturu proteina što rezultira izmjenom kinetike enzimske reakcije (165).

Glavna biokemijska obilježja bolesti zbog nedostatne aktivnosti SAHH-a su povišene koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i Met-a, uz normalan ili blago povišeni ukupni Hcy (166). U svih bolesnika izmjerena je višestruko povišena koncentracija AdoMet-a (1,7 do 55 puta) i AdoHcy-a (5 do 300 puta) u plazmi (38-44,162-166) i snižen omjer AdoMet-a/AdoHcy-a (niži od 1,13). Koncentracija metionina u plazmi bolesnika može biti u granicama vrijednosti koje se smatraju fiziološkim (39,40,16). Blago povišenje ukupnog Hcy-a u nekih bolesnika objašnjava se inhibitornim djelovanjem povišenog AdoMet-a na MTHFR i poremećenu remetilaciju Hcy-a u Met. Svi bolesnici su imali povišenu kreatin kinazu (CK) (5 do 70 puta). Nositelji samo jedne mutacije gena *AHCY* nisu imali kliničkih niti biokemijskih pokazatelja bolesti, a koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a, kao i metilacijski potencijal su im bili normalni (38).

Klinička slika značajno varira u opisanih bolesnika te je moguće da ovisi o ostatnoj aktivnosti enzima SAHH. Tako je u dvije blizanke opisan fetalni hidrops zbog zatajenja jetre, teška hipotonija, razvojna anomalija mozga (atrofija bijele tvari, hipoplazija korpusa kalozuma, prednjeg dijela ponsa i dijelova malog mozga, široka cisterna magna) i zatajenje disanja koji su rezultirali smrtnim ishodom u ranoj dojenačkoj dobi (43). U većine u literaturi opisanih bolesnika sa srednje teškom kliničkom slikom simptomi i znakovi bolesti pojavili su se u novorođenačkoj ili dojenačkoj dobi (167). Svi su imali miopatiju i/ili trajno povišenu aktivnost kreatin kinaze. U različitim kombinacijama imali su zaostatak u psihomotoričkom razvoju različitog stupnja, poremećaje ponašanja, mikrocefaliju, zakašnjelu mijelinizaciju, strabizam, koagulopatiju i oštećenje jetre. Biopsija mišića učinjena u nekih pacijenata pokazala je distrofiju mišića. 2015. godine Stadler i suradnici opisali su bolesnicu u koje se klinička slika razvila u kasnijoj životnoj dobi. Bolesnica s mutacijom c.146G>A/c.146G>A 49R>H/49R>H prve znakovi hepatopatije i slabosti mišića razvila je tek u dvadesetim godinama života, u dobi od 30 godina je oboljela od hepatocelularnog karcinoma te preminula u dobi od 32 godine. Njezin sin, nositelj istih mutacija, u dobi od sedam godina bio je bez ikakvih simptoma, iako je imao povišene koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi (162). 2017. godine opisana su dva brata

i sestra koji imaju dvije heterozigotne mutacije gena *AHCY* (p.49R>C i p.363T>I) i značajno povećanje koncentracije AdoHcy-a i AdoMet-a u plazme te kliničku sliku koja se ne podudara s onom u dosad opisanih bolesnika (164). Tako je dječak u dobi od 14 godina imao infantilni autizam i insuficijenciju gušterače, djevojčica u dobi od 5 godina cerebralnu paralizu i spasticitet, dok je dječak u dobi od 2 godine imao mišićnu hipotoniju, psihomotoričko zaostajanje i epilepsiju. Niti jedno dijete nije imalo povišene aminotransferaze i CK, kao niti zakašnjelu mijelinizaciju. U navedenih bolesnika potrebno je još odrediti aktivnost enzima SAHH kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da je njihova klinička slika posljedica njegove nedostatne aktivnosti.

S obzirom na izrazitu varijabilnost kliničke slike i izrazito povišene koncentracije AdoHcy-a i snižen metilacijski potencijal moguće je da neki od dosad neopisanih bolesnika ima i prirodenu srčanu grešku.

2. HIPOTEZA

1. Povišena koncentracija AdoMet-a čimbenik je rizika za pojavu prirodene srčane greške.
2. Povišena koncentracija AdoHcy-a čimbenik je rizika za pojavu prirodene srčane greške.
3. Snižen omjer koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a čimbenik je rizika za pojavu prirodene srčane greške.
4. Polimorfizmi gena *ACHY* (SAHH-2 i SAHH-3) mogu pridonijeti pojavi prirodene srčane greške.

3. CILJEVI RADA

- utvrditi doprinosi li poremećaj metilacije patogenezi prirođenih srčanih grešaka
- utvrditi ima li novorođenčad s prirođenom srčanom greškom povišenu koncentraciju AdoMet-a u plazmi u odnosu na zdravu novorođenčad
- utvrditi ima li novorođenčad s prirođenom srčanom greškom povišenu koncentraciju AdoHcy-a u plazmi u odnosu na zdravu novorođenčad
- utvrditi ima li novorođenčad s prirođenom srčanom greškom snižen omjer koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi u odnosu na zdravu novorođenčad
- utvrditi imaju li majke novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom povišenu koncentraciju AdoMet-a u plazmi u odnosu na majke djece koja ne boluju od prirodene srčane greške
- utvrditi imaju li majke novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom povišenu koncentraciju AdoHcy-a u plazmi u odnosu na majke djece koja ne boluju od prirodene srčane greške
- utvrditi imaju li majke novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom niži omjer koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi u odnosu na majke djece koja ne boluju od prirodene srčane greške
- analizirati polimorfizme SAHH-2 i SAHH-3 gena *ACHY* u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i usporediti dobivenu učestalost s onom u zdravoj populaciji
- analizirati polimorfizme SAHH-2 i SAHH-3 gena *ACHY* u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i usporediti dobivenu učestalost s onom u zdravoj populaciji

4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

4.1. ISPITANICI

Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno na novorođenčadi oba spola nakon postavljanja dijagnoze prirođene srčane greške putem ehokardiografije srca, kateterizacije srca ili operativnog zahvata srca. Uključena su donošena novorođenčad koja imaju srčanu grešku, a nemaju sindrom poznate etiologije. Novorođenčad koja imaju otvoren duktus Botallo i otvoren foramen ovale nisu bila uključena u istraživanje jer ta stanja mogu biti posljedica produžene prilagodbe na ekstrauterine prilike. Istraživanje je provedeno i na majkama navedene novorođenčadi i to u dobi majki od šest tjedana do godine dana nakon poroda. Naime, dokazano je se da koncentracija homocisteina, folata i vitamina B₁₂ značajno mijenja tijekom trudnoće da bi nakon šest tjedana iza poroda, ukoliko majka nije značajno mijenjala svoje životne navike (pušenje, prehrana, alkohol), bila ista kao u perikonceptijskom razdoblju (168). Koncentracija homocisteina, folne kiseline i vitamina B₁₂ ne bi se trebala mijenjati u periodu od jedne do dvije godine života (169). Na taj način bi koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u tom periodu života trebale oslikavati stanje u perikonceptijskom razdoblju kada se embriogeneza i događa. Isključene su ispitanice koje su u trenutku uzimanja uzorka bile trudne.

Prije uključivanja u istraživanje, majke ispitanika koji su zadovoljavali uključne kriterije, a nisu imali zadovoljen niti jedan isključni kriterij, dobile su usmenu i pisanu obavijest o istraživanju. Također im je uručen i obrazac informiranog pristanka za njih i za njihovo dijete koje boluje od prirođene srčane greške. Majkama ispitanika objašnjeno je da je sudjelovanje u istraživanju dobrovoljno i da će njihovi osobni podaci biti zaštićeni.

Tablica 4. Deskriptivna statistika uzoraka novorođenčadi. Razlika u razdiobi frekvencija spolova i dobi po tjednima između ispitivane i kontrolne skupine testirana je Fisherovom egzaktnim testom ili Wilcoxonovim testom sume rangova (razlika u medijanu dobi)

	Ispitanici	Referentna skupina	<i>p</i>
N	127	50	
Muški spol, N (%)	75 (59)	28 (56)	0,618
Ženski spol, N (%)	52 (41)	22 (44)	
Dob u danima, M (IQR)	6,5 (4,0 – 11,0)	3,0 (2,0 – 10,0)	0,012
Dob - 1. tjedan, N (%)	64 (50)	31 (65)	0,100
Dob - 2. tjedan, N (%)	39 (31)	8 (16)	
Dob - 3. tjedan, N (%)	10 (8)	6 (12)	
Dob - 4. tjedan, N (%)	14 (11)	5 (6)	
Smrtnost, N (%)	27 (21)		
Prisustvo srčanih grešaka kod braće i sestara, N (%)	8 (6)		
Broj pobačaja, N (%)	29 (23)		
Broj mrtvorodenih, N (%)	2 (1)		
Aдекватna primjena folne kiseline u prvom tromjesječju trudnoće	14 (10)		
Nepotpuna primjena folne kiseline u prvom tromjesječju	21 (15)		
Aдекватna primjena vitamina B ₁₂ u prvom tromjesječju trudnoće	6 (4)		
Nepotpuna primjena vitamina B ₁₂ u prvom tromjesječju	11 (8)		

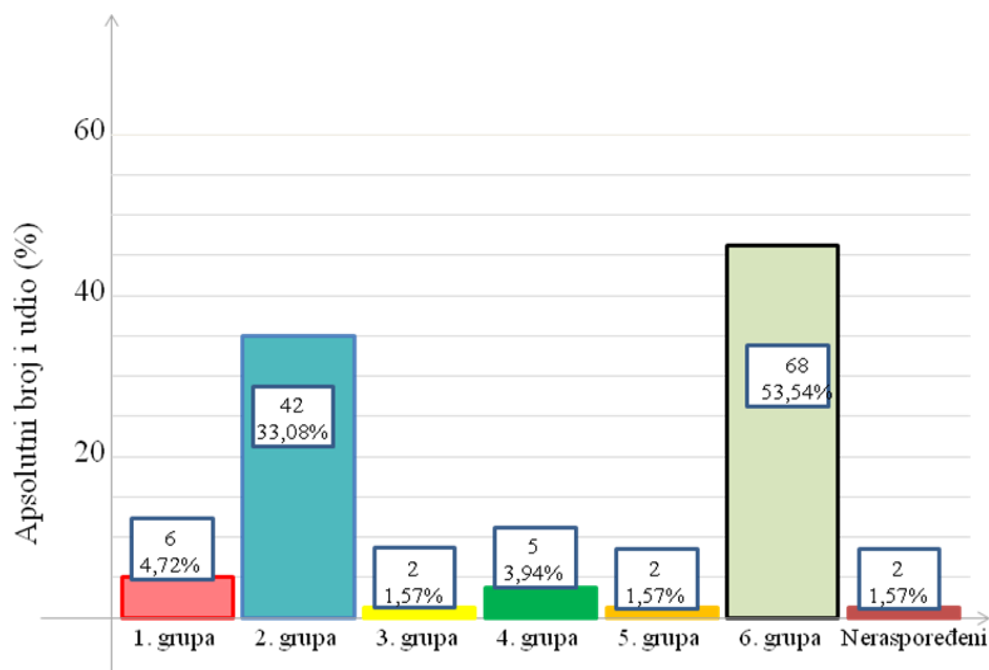
M – medijan, IQR – interkvartilni raspon, N – broj ispitanika, P – razina značajnosti

U istraživanje smo uključili 127 novorođenčadi oba spola s prirođenom srčanom greškom i 103 majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom (tablica 4). Od ukupno 127

novorođenčadi 52 je bilo ženskog, a 75 muškog spola. Raspodjela po tjednima pokazala je da je u prvom tjednu života u trenutku uzimanja uzorka bilo 64 novorođenčadi, u drugom tjednu 39 novorođenčadi, u trećem tjednu 10 novorođenčadi i u četvrtom tjednu 14 novorođenčadi. Do trenutka analize podataka ove disertacije 27 ispitanik je umro. Osmero novorođenčadi imalo je brata ili sestru koji boluju ili su bolovali od prirodene srčane greške. Majke 29 novorođenčadi prethodno su imale jedan ili više spontanih pobačaja, dok su majke dva novorođenčeta prethodno rodile mrtvorodenče.

S obzirom na raspodjelu prirodnih srčanih grešaka prema Clarkovoj teoriji (tablica 2) najviše je ispitanika u skupini 6 (68 novorođenčadi), zatim u skupini 2 42 novorođenčadi, dok se u ostalim skupinama nalazi mali broj ispitanika (u skupini 1 šestoro novorođenčadi, u grupi 3 dvoje novorođenčeta, grupi 4 petoro novorođenčadi, u grupi 5 dvoje novorođenčadi i dvoje novorođenčadi koji se ne mogu rasporediti u niti jednu skupinu po Clarku) (slika 9).

Slika 9. Ispitivane skupine novorođenčadi s obzirom na raspodjelu prirodnih srčanih grešaka prema Clarkovoj teoriji



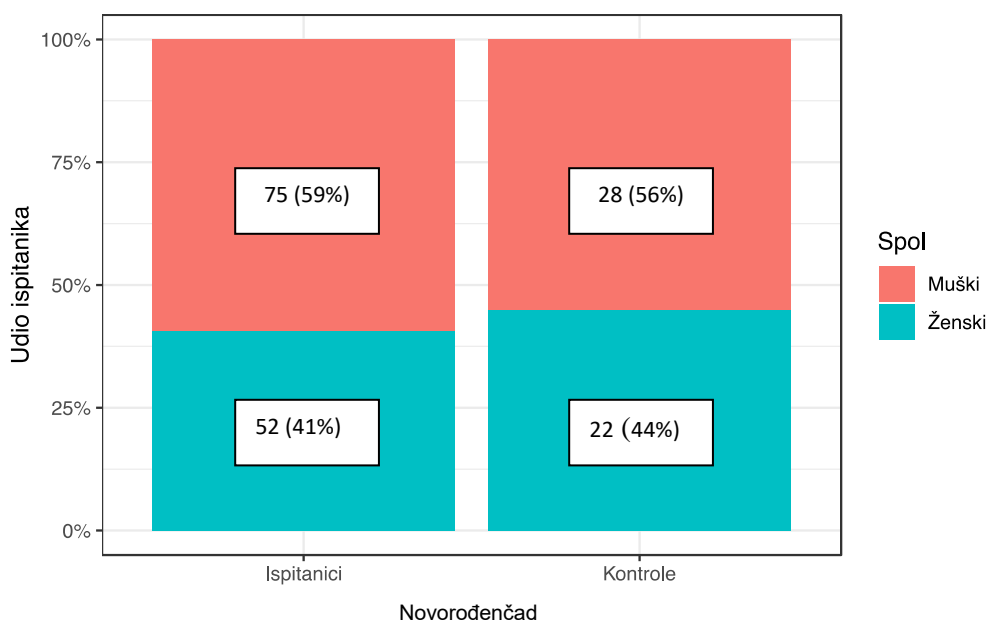
Referentnu skupinu za novorođenčad čini 50 zdrave novorođenčadi oba spola (22 ženskog spola i 28 muškog spola) u kojih je mjerenje AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog

potencijala bilo učinjeno u sklopu određivanja referentnih vrijednosti za AdoMet i AdoHcy u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Raspodjela po tjednima pokazala je da je u prvom tjednu života u trenutku uzimanja uzorka bilo 31 novorođenači, u drugom tjednu sedmero novorođenači, u trećem tjednu sedmero novorođenači i u četvrtom tjednu petero novorođenači.

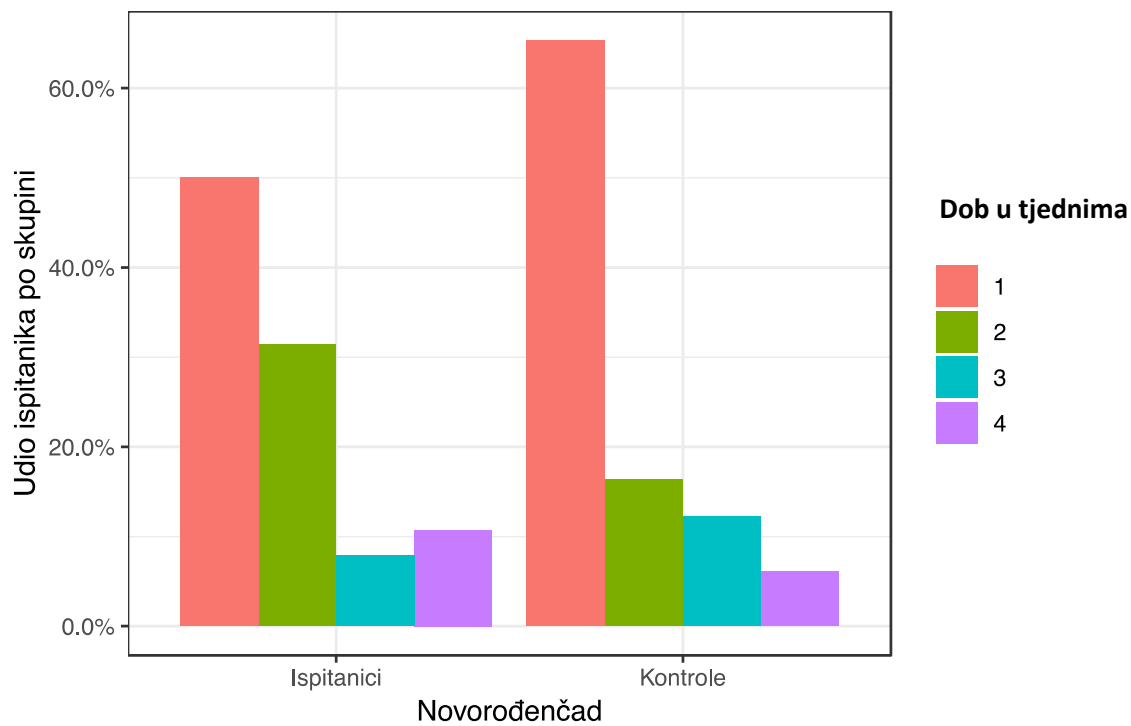
Raspodjela po spolu i po dobi u tjednima je bila slična u ispitivanoj i referentnoj skupini novorođenači (slika 10 i 11).

Referentnu skupinu za majke novorođenači s prirođenim srčanim greškama činile su zdrave žene reproduktivne dobi (20 do 45 godina). U njih je mjerenje koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i određivanje metilacijskog potencijala također bilo učinjeno u sklopu određivanja referentnih vrijednosti za AdoMet i AdoHcy u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Slika 10. Usporedba ispitivane i referentne skupine novorođenači u odnosu na spol, Fisherov egzakti test, $p=0,618$



Slika 11. Usporedba ispitivane i referentne skupine novorođenčadi u odnosu na dob uzorkovanja u tjednima, Fisherov egzaktni test, $p=0,100$



4.2. MATERIJALI I METODE

4.2.1. Prikupljanje podataka

Informacije o ispitanicima prikupljene su putem anketnog lista (Prilog 1) koji su ispunili liječnici ili majke ispitanika, uz pomoć liječnika. Dodatni podatci su, prema potrebi, dobiveni i izravnim kontaktom s liječnicima koji su skrbili o ispitanicima. Podatci iz anketnog lista su obrađeni u Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Identitet ispitanika i svi drugi podatci dobiveni putem anketnog lista bili su dostupni samo glavnom istraživaču na projektu u sklopu kojeg se istraživanje provodilo (mentor ove doktorske disertacije), podistraživaču (doktorandu) te najbližim suradnicima.

4.2.2. Mjerenje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemskom spektrometrijom masa

Koncentracije spojeva AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi iz uzoraka pune krvi izmjerene su metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Budući da su koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi jako niske, potrebna je izrazito osjetljiva metoda za njihovo mjerenje. U svrhu izrade ove doktorske disertacije laboratorij je prilagodio metodu opisanu u *Gellekink i suradnici: LC-ESI-MS/MS Measurment of AdoMet and AdoHcy* (60) na tekućinskom kromatografu spregnutom s tandemskim spektrometrom masa Nexera X2-8050 MS/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan).

4.2.2.1. Reagensi i sastav otopina

1. Octena kiselina, 1M;
2. Mravlja kiselina, 0,1 M: 4,2 mL mravlje kiseline (HCOOH, Mt 46,03) do 100 mL redestilirane vode;
3. Amonijev acetat (0.02M, pH 8.8 podešen s amonijakom);
4. Amonijak 1M;
5. S-(5'-Adenosyl)-L-homocysteine-d4, MT 388,4 (Medical isotopes, Inc., Pelham, USA)

6. S-(5'-Adenosyl)-L-methionine-d3 Disulfate Salt, MT 597,61 (Medical isotopes, Inc., Pelham, USA)
7. S-(5'-Adenosyl)-L-methionine Disulfate Salt, MT 594,59 (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) S-adenozilmetionin (SAM, AdoMet), 1 mM, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, SAD; A-7007: 0,0056 g na 10 mL 20 mM TRIS/HCl, pH 7,4;
8. S-(5'-Adenosyl)-L-homocysteine, MT 384,41 (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) S-adenozilhomocistein (SAH, AdoHcy), 1 mM, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, SAD; A-9384: 0,0038 g na 10 mL 20 mM TRIS-HCl, pH 7,4;
9. 1-Metiladenozin, 1 mM, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, SAD; M-5001: 0,028 g na 100 mL 0,6 N perklorne kiseline;
10. Metanol za LC-MS (Merck, Darmstadt, Njemačka, kataloški broj: 1060351000);
11. Radna otopina internog standarda (IS): 95,2 µL AdoMet (konc. 168 µmol/L) i 6,16 µL AdoHcy (konc. 650 µmol/L) otpipetiranih u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se dopuni LC-MS Grade vodom
12. LC-MS Grade Voda (LiChrosolv, Merc, Darmstadt, Njemačka, kataloški broj: Z0500833 815)
13. Mobilna faza A: 500 mL H₂O i 50 µL octena kiselina
14. Mobilna faza B: 500 mL metanol i 50 µL octena kiselina

4.2.2.2. Oprema i pribor

1. SPE (solid-phase extraction) kolone (Agilent Bond Elut LRC-PBA, Santa Clara, SAD)
2. Tekućinski kromatograf spregnut s tandemskim spektrometrom masa Nexera X2-8050 MS/MS s ESI kondenzatorom u negativnom modu (Shimadzu, Kyoto, Japan)
3. Symmetry Shield HPLC C₁₈ kolona (Waters Corporation, Milford, MA, SAD)
4. Automatske podesive pipete i nastavci: 100, 200, 1000 i 5000 µl (Eppendorf, Njemačka)
5. Centrifuga (MPW-223e, MPW Med. instruments, Varšava, Poljska)
6. Vibracijska i magnetska mješalica (Kartell, Italija)
7. Sistem za dobivanje vode visoke čistoće (Nirosta, Osijek, Hrvatska)
8. Analitička vaga (Ohaus, SAD)
9. LabSolution software (Shimadzu, Kyoto, Japan)

4.2.2.3. Postupak pripreme uzoraka za analizu

4.2.2.3.1. Uzorkovanje krvi i priprema uzoraka za mjerenje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina

Ispitaniku se natašte ili dva do tri sata nakon obroka (dva do tri sata za novorođenče, četiri sata za odrasle) izvadi venska krv u epruvetu s EDTA i promiješa. Uzorak se odmah stavlja na led i unutar pola sata se centrifugira na 3500 okretaja kroz 10 minuta. Iz uzorka se odvoji 500 μL plazme i promiješa s 50 μL 1M octene kiseline kako bi se postigla koncentracija octene kiseline od 0,091 mol/L. Odvojena plazma se pohranjuje na -80°C do analize.

4.2.2.3.2. Izdvajanje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina putem SPE-kolona

Pročišćavanje uzoraka učinjeno je putem SPE-kolona (*solid-phase extraction*) (Agilent Bond Elut LRC-PBA, SAD) koje sadrže fenilbornu kiselinu koja na pH 7 do 8 veže cis diolne skupine. SPE-kolone su prethodno tretirane dva puta s 1 mL 0,1M mravlje kiseline i dva puta s 1 ml amonijevog acetata (0,02M, pH 8,8 podešen s amonijakom). Prije pročišćavanja zakiseljeni uzorci se odleđuju, promiješaju u miješalici i neutraliziraju s 100 μL 1M amonijaka kako bi se postigao pH 7,4 do 7,5. Tako neutraliziranim uzorcima dodaje se 100 μL internog standarda: 1,5 $\mu\text{mol/L}$ za $^2\text{H}_3$ -AdoMet-a i 0,41 $\mu\text{mol/L}$ za $^{13}\text{C}_5$ -AdoHcy-a. Mješavina se zatim nasloji na SPE-kolone kako bi se za kolone vezali AdoMet, AdoHcy te $^2\text{H}_3$ -AdoMet i $^{13}\text{C}_5$ -AdoHcy. Nečistoće se otklanjaju dvostrukim propiranjem kolona s 1 ml amonijevog acetata (0,02M, pH 8,8). AdoMet i AdoHcy se eluiraju s kolona s 500 μL 0,1M mravlje kiseline. Nakon toga su uzorci stabilni sljedećih 6 mjeseci i mogu biti pohranjeni na -20°C prije daljnje analize.

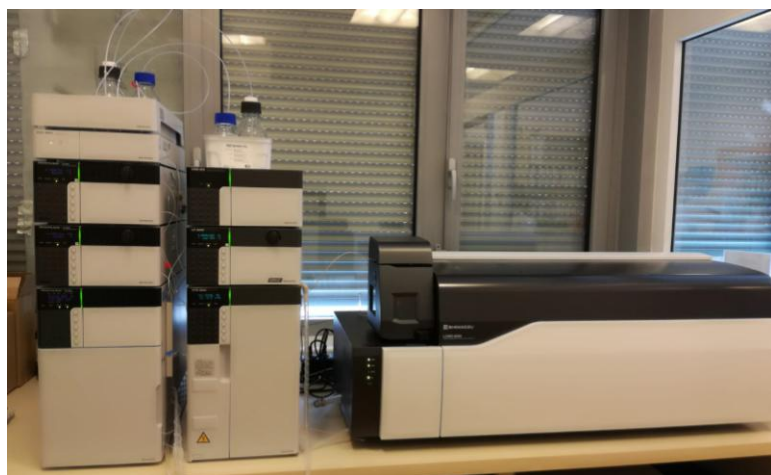
4.2.2.4. Razdvajanje S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je kromatografska tehnika za razdvajanje smjese molekula te kvalitativno i kvantitativno mjerenje njihove koncentracije. Uzorak s AdoMet-om i AdoHcy-em (10 μL) se nanese (injektira) na C_{18} kolonu SynergiTM 4 μm Fusion-RP 80Å, 50 x 2mm i eluira s mobilnim fazama prema sljedećem protokolu:

3,5 min	Pumpa B (mobilna faza B), koncentracija	100%
4,0 min	Pumpa B (mobilna faza B), koncentracija	100%
7,0 min	Pumpa B (mobilna faza B), koncentracija	0%
10,0 min	Pumpa B (mobilna faza B), koncentracija	0%

Vrijeme retencije iznosi 0,63 minute za AdoMet i 1,50 min za AdoHcy. Koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a su mjerene putem LC-ESI-MS/MS sa LCMS-8050 sa ESI-ionizatorom u negativnom modu.

Slika 12. Shimadzu HPLC Nexera s pridruženim LCMS 8050



4.2.2.4.1. Priprema otapala i HPLC-uređaja

AdoMet, AdoHcy i pripadajući interni standardi (IS) su mjereni s LC-MS/MS Shimadzu. Volumen injektiranja bio je 10 μ L, ukupni protok 0,25 mL/min, prolaz 10 min, kolona je grijana na 250°C, toplinski blok je iznosio 400°C, protok plina za raspršivanje 3,0 L/min, plina za sušenje 10 L/min. Fenomen kolone C18 iznosio je 50x2,0 mm.

Pumpa A: voda + octena kiselina

Pumpa B: metanol+ octena kiselina

Gradijent: 3,50 min B 100%

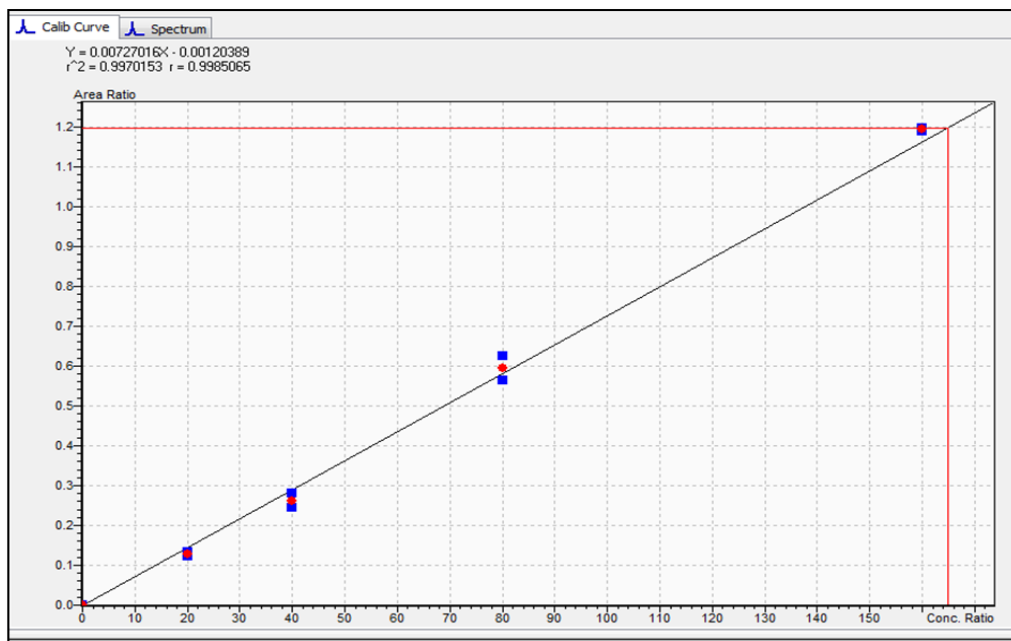
4,00 min B 100%

7,00 min B 0%

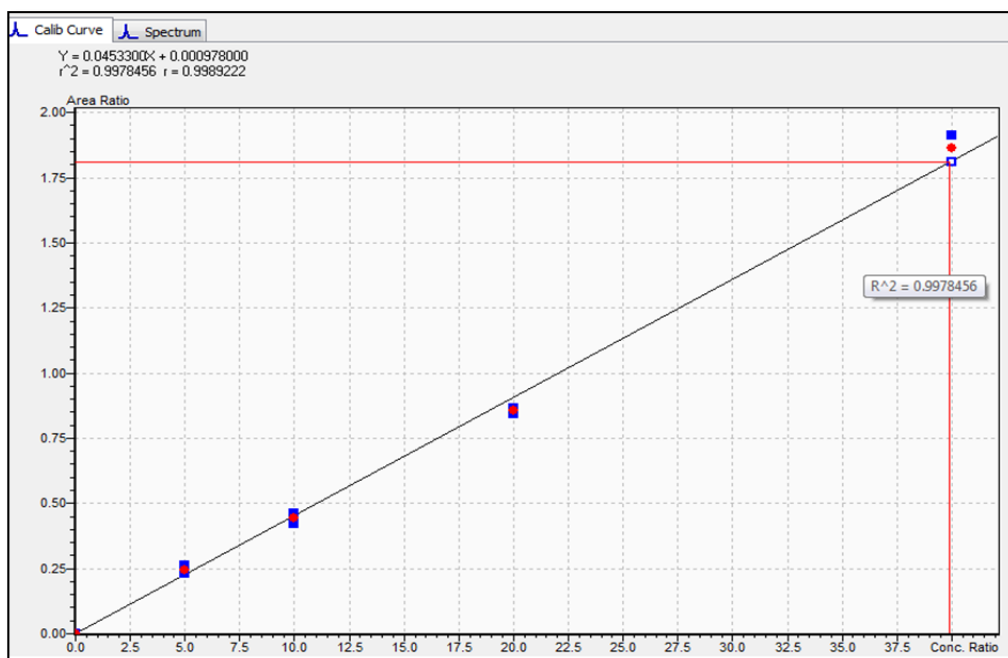
10,00 min B 0%

Nakon kondicioniranja HPLC-sustava analizirani su standardi IS, AdoMet i AdoHcy. Prije su priređene matičnica AdoMet (S-adenosil-L-methionin) 1 mM i matičnica AdoHcy (S-adenosil-L-homocistein) 1 mM te interni standardi (IS). Radna otopina se dobila otapanjem 95,2 µL AdoMet-a (konc. 168 µmol/L) i 6,16 µL AdoHcy-a (konc. 650 µmol/L) koji se odpipetiraju u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se dopuni vodom *LC-MS Grade*. Matičnice AdoMet-a i AdoHcy-a u takvoj vodi otopljene su u amonijevom acetatu te su napravljene otopine koncentracije 0, 5, 10, 20, 40 nmol/l AdoHcy-a i 0, 20, 40, 80, 160 nmol/L AdoMet-a. Dodali smo 125 µL internog standarda u 500 µL kalibracijske otopine i dalje ih tretirali kao uzorke ispitanika (opisano u 4.2.2.3.2.) Kalibracijske krivulje dobivene su ucrtavanjem omjera “*peak area*” (kalibrator/IS) prema koncentraciji kalibratora (slika 12. i 13.)

Slika 13. Primjer određivanja krivulje AdoMet-a sa Shimadzu HPLC Nexera s pridruženim LCMS 8050



Slika 14. Primjer određivanja krivulje AdoHcy-a sa Shimadzu HPLC Nexera s pridruženim LCMS 8050



Dobiveni podaci obrađeni su u programu *LabSolution software, Shimadzu*. Za validaciju metode ispitana je točnost, preciznost, linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije i stabilnost analita u dugom intervalu, kroz 21 dan, koji su zadovoljavali kriterije koje preporučuje Međunarodna konferencija za harmonizaciju (ICH, od engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*).

4.2.2.5. Referentne vrijednosti za S-adenozilhomocistein, S-adenozilmetionin i metilacijski potencijal u našem laboratoriju

Ranije je izmjerena koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u zdrave novorođenčadi i zdravih žena i muškaraca reproduktivne dobi, za potrebe dobivanja referentnih raspona navedenih metabolita u plazmi, a nakon što je laboratorijska metoda bila validirana (170). Na temelju dobivenih rezultata utvrđene su značajne razlike s obzirom na dob. U novorođenčadi referentni raspon za AdoMet u plazmi iznosi 129,4 – 321,5 nmol/L, a za AdoHcy 28,35 – 126,65 nmol/L. Metilacijski potencijal (metilacijski indeks) tj. omjer AdoMet-a/AdoHcy-a (MI) je u

većine zdrave novorođenčadi (47/50) između 1,4 i 7,26, a medijan metilacijskog potencijala je približno 2,35.

U žena reproduktivne dobi koncentracije navedenih metabolita u plazmi su znatno niže nego u novorođenčadi, dok je metilacijski potencijal viši. Referentni raspon za AdoMet u plazmi iznosi 57,5-112,5 nmol/L, a za AdoHcy 8,88-23,52 nmol/L. Metilacijski potencijal, tj. omjer AdoMet-a/AdoHcy-y (MI), je u većine žena između 3,74 do 8,65 (43/47), a medijan metilacijskog potencijala je približno 5,54.

4.2.3. Određivanje polimorfizama gena *ACHY* (SAHH-2 i SAHH-3)

4.2.3.1. Izdvajanje genomske DNA

Krv za izdvajanje genomske DNA je uzorkovana u epruvete s EDTA (BD Vacutainer Systems), a do postupka izdvajanja je bila pohranjena na -20°C . Iz 200 μL uzorka krvi ispitanika izdvojena je genomska DNA pomoću komercijalnog seta za izdvajanje DNA (Miniprep Quick DNA Plus Kit, Zymo Research, Irvine, SAD). 200 μL krvi ispitanika naslojilo se u epruvetu za mikrocentrifugu koja se pomiješala s 200 μl pufera za lizu stanica (BioFluid & Cell Buffer) i s 25 μL proteinaze K te se inkubirala 10 do 15 minuta na temperaturi od 55°C . 425 μL nastale smjese se pomiješalo s 425 μL vezujućeg pufera (Genomic Binding Buffer), inkubiralo kroz 10 do 15 min te naslojilo u novu epruvetu koju se stavilo u Zymo-Spin™ IIC-XL kolumne i centrifugiralo na 12000xg okretaja 1 minutu. Filtrat se odstranio, a vezana DNA se ispirala s 400 μL pufera za predispiranje (DNA Wash Buffer) i centrifugirala na 12000xg okretaja 1 minutu. Odstranio se supernatant i dodalo 700 μl pufera za ispiranje (g-DNA Wash Buffer) te centrifugiralo na 12000xg okretaja 1 minutu. Odstranio se supernatant i dodalo 200 μl pufera za ispiranje (g-DNA Wash Buffer) te opet centrifugiralo na 12000xg okretaja 1 minutu. Dobiveni sadržaj se premjestio u čistu epruvetu za mikrocentrifugu te dodalo 50 μl pufera za otapanje (DNA Elution Buffer) ili vode direktno na matriks. Nakon 5-minutne inkubacije na sobnoj temperaturi centrifugiralo se na maksimalnoj brzini 1 minutu kako bi se eluirala DNA. Eluirana DNA se mogla odmah iskoristiti ili pohraniti na -20°C . Koncentracija DNA dobivene ovim postupkom iznosila je 20-60 ng/ μL .

4.2.3.2. Sekvenciranje egzona 2, 3 i 4 gena *AHCY*

Sekvenciranje egzona 2, 3 i 4 učinjeno je dideoksi-metodom po Sangeru (171). Za sekvenciranje se koristio „*BigDye® Terminator Cycle*“ set za sekvenciranje (*Applied Biosystems*) prema uputama proizvođača te specifične početnice za gen *AHCY*. Koncentracija otopine početnice iznosila je 10 μ M. Elektroforeza i vizualizacija kromatograma se vršila na uređaju za sekvenciranje „*ABI PRISM DNA sequencer*” (*Applied Biosystems*) u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Programski alat *SnapGene 3.0* (<https://www.snapgene.com>) korišten je za analizu kromatograma.

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) su umnoženi egzoni 2, 3 i 4 gena *AHCY* koristeći oligonukleotide INahh18 i INahh21 što je generiralo PCR-umnožak od 3441 parova baza. Inicijalno se denaturirala DNA u trajanju od 3 od 5 minuta na temperaturi od 94°C. Pritom su se razdvajili spareni lanci DNA koji služe kao kalupi za amplifikaciju. Zatim se provela hibridizacija primera na komplementarne odjeljke DNA na 55°C. Sljedeći korak je sinteza komplementarnog lanca na temperaturi od 72°C, s tim da Taq-polimeraza ugrađuje nove komplementarne nukleotide sve dok ne stigne do drugog primera. PCR-protokol se odvijao u 35 ciklusa. Tako umnoženi PCR-odsječak podvrgnut je sekvenciranju oba lanca metodom po Sangeru (171).

Tablica 6. Oligonukleotidi za PCR (orijentacija 5' – 3')

Egzon	Prednja početnica	Stražnja početnica
2, 3 i 4 (3441 bp)	INahh18 GTGGATCGGGGTCCATGCAGTGA	INahh21 GGCCTGCGGCCATCATGTGGGCA
2 (314 bp)	INahh1 CTCTTGGTTGGTGGGAT	INahh15 CGTCTTCTTCCCTGGCTGAA
3 (193 bp)	INahh16 AGCGTCCCTGGTGCTTTTGA	INahh2 GGCAGAATCCCTTCACA
4 (300 bp)	INahh9 CTGGAGCAGGTACCAGTT	INahh3 CACCCAGGCCACCAGCA

Slika 15. Redoslijed nukleotida u egzonima 2, 3 i 4 gena *AHCY*. Egzoni su označeni masnim slovima, a pozicije početnica koje su smještene u intronima su podcrtane.

Egzon 2

**CCTCTTGGTTGGTGGGATGAGGGGACTCACGGAACTCCCACCTGTTTCCTCCCGTAG
CCGACATCGGCCTGGCTGCCTGGGGACGCAAGGCCCTGGACATTGCTGAGAAC
GAGATGCCGGGCCTGATGCGTATGCGGGAGCGGTACTCGGCCTCCAAGCCACT
GAAGGGCGCCCGCATCGCTGGCTGCCTGCACATGACCGTGGAGACGGCCGTCC
TCATTGAGACCCTCGTCACCCTGGGTGCTGAGGTGAGGCCACAGCTGTATCACC
CCAGAGTCCTTGCCCTCCCTGGGTTCAGCCAGGGAAGAAGACG**

Egzon 3

**AGCGTCCCTGGTGCTTTTGAGCCATCAGTGACCAACAGCCTTGTTTTGATGGCTCTTC
TAGGTGCAGTGGTCCAGCTGCAACATCTTCTCCACCCAGGACCATGCGGGCGGC
TGCCATTGCCAAGGCTGGCATTCCGGGTAAGTCCTGCTTGCTTCTGAGACGTGGA
ATTTGTGAAGGGATTCTGCC**

Egzon 4

**CTGGAGCAGGTACCAGTTGGGAAGTCCAGGCCCTGATGTGCCACTCACCTCCAGT
GTATGCCTGGAAGGGCGAAACGGACGAGGAGTACCTGTGGTGCATTGAGCAGA
CCCTGTACTTCAAGGACGGGCCCTCAACATGATTCTGGACGACGGGGGCGAC
CTCACCAACCTCATCCACACCAAGTACCCGCAGCTTCTGCCAGGTGAGCAGGGC
GGGGCAGGTGGGCTGGGTGCTGGTGGCCTGGGTG**

4.3. STATISTIČKE METODE

Kategorijski su podaci prikazani apsolutnim i relativnim frekvencijama, a neprekinute varijable medijanom, interkvartilnim rasponom te minimum, maksimumom, 5. i 95. centilom u slučaju koncentracija S-adenozilmetionina (AdoMet-a), S-adenozilhomocisteina (AdoHcy-a) i metilacijskog potencijala (MI). Podatci su grafički prikazani stupičastim dijagramom (u slučaju relativnih frekvencija), točkastim dijagramom (u slučaju prikaza povezanosti varijabli) te dijagramom brkate kutije (engl. *box-and-whiskers plot*; u slučaju prikaza neprekinutih varijabli za različite kategorije) pri čemu je medijan označen debelom crnom linijom, a prvi i treći kvartil su omeđeni kutijom. Brkovi sežu do najekstremnijeg mjerenja unutar vanjske granice definirane kao 1,5 interkvartilnih raspona od prvog ili trećeg kvartila, a vrijednosti izvan vanjske granice (stršeće vrijednosti) su označene točkama.

Zbog nemogućnosti aproksimacije razdiobe podataka na normalnu razdiobu, korišteni su neparametrijski testovi. Pri testiranju kategorijskih podataka korišten je Fisherov egzaktni test. Razlike neprekinutih varijabli testirane su Wilcoxonovim testom sume rangova (u slučaju dvije grupe) ili Kruskal-Wallisovim testom (u slučaju triju ili više grupa) nakon kojeg je, u slučaju odbacivanja nulte hipoteze, za utvrđivanje razlike između pojedinih grupa primijenjen Conoverov test za nezavisna mjerenja uz Bonferronijevu korekciju p-vrijednosti na višestruko testiranje. Povezanost varijabli ispitana je Spearmanovom korelacijom pri čemu je ovisno o statističkoj značajnosti Spearmanov koeficijent tumačen kao slaba ($|r| < 0,3$), srednje jaka ($0,3 < |r| < 0,6$) ili jaka ($|r| > 0,6$) korelacija. Predikcijski model 5., 50. i 95. centila S-adenozilmetionina (AdoMet-a), S-adenozilhomocisteina (AdoHcy-a) i metilacijskog potencijala (MI) na temelju prisutnosti prirodene srčane greške te dobi određen je kvantilnom regresijom, pri čemu je standardna pogreška određena metodom višestrukog ponovnog uzorkovanja (engl. *bootstrap*).

Svi su podaci analizirani uz razinu statističke značajnosti $p=0,001$, a pritom je korišten programski jezik R (verzija 3.5.1).

5. REZULTATI

5.1. S-ADENOZILMETIONIN, S-ADENOZILHOMOCISTEIN I METILACIJSKI POTENCIJAL U NOVOROĐENČADI S PRIROĐENOM SRČANOM GREŠKOM I U NJIHOVIH MAJKI

5.1.1. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u plazmi novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u referentnoj skupini

Izmjerali smo koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi ranije opisanom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemskim spektrometrom masa u 127 novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom uključenih u istraživanje. Podatke dobivene mjerenjem usporedili smo s vrijednostima u ispitanika referentne skupine.

Tablica 7. Koncentracije AdoMet-a (nmol/L), AdoHcy-a (nmol/L) i metilacijski potencijal (MI) u plazmi ispitanika ispitivane i referentne skupine: Wilcoxonov test sume rangova

	Skupina	N	Min	5. centila	25. centila	Medijan	75. centila	95. centila	Max	
AdoMet	Novorođenčad	Ispitanici	127	90,0	141,6	219,5	289,0	356,0	581,5	1050,0
		Referentna skupina	50	74,0	132,1	153,8	184,0	221,3	284,7	379,0
	Majke	Ispitanici	103	12,0	52,2	69,5	81,0	96,5	137,8	302,0
		Referentna skupina	47	52,0	64,0	74,4	81,9	92,7	111,3	119,1
AdoHcy	Novorođenčad	Ispitanici	127	16,00	26,30	47,50	67,01	90,50	171,23	225,00
		Referentna skupina	50	24,00	30,70	53,00	81,50	95,25	121,85	129,00
	Majke	Ispitanici	103	5,00	9,03	14,00	20,00	26,50	45,60	75,00
		Referentna skupina	47	7,93	10,12	13,03	15,18	17,38	21,84	45,32
MI	Novorođenčad	Ispitanici	127	1,797	2,225	3,139	4,343	5,920	8,010	10,900
		Referentna skupina	50	0,800	1,400	1,900	2,350	3,512	6,545	8,500
	Majke	Ispitanici	103	0,885	1,865	3,294	4,545	5,646	7,989	9,700
		Referentna skupina	47	1,796	3,800	4,711	5,541	6,330	8,306	9,536

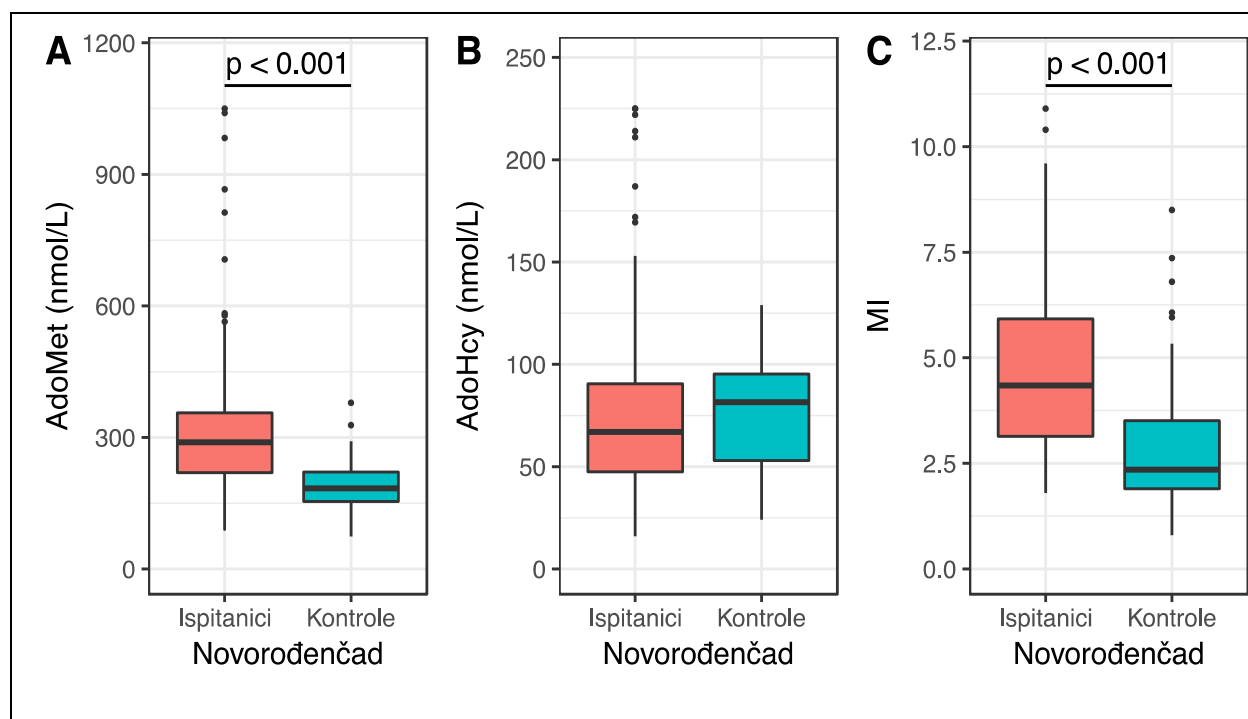
N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, Max – najveća vrijednost, MI – metilacijski potencijal

Tablica 8. Razlike između skupina: rezultati Wilcoxonovog testa sume rangova iz podataka u tablici 7

		Skupina	N	W	Z	p
AdoMet	Novorođenčad	Ispitanici	127			
		Referentna skupina	50	4909	6,22	< 0,001
	Majke	Ispitanici	103			
		Referentna skupina	47	2293	-0,52	0,607
AdoHcy	Novorođenčad	Ispitanici	127			
		Referentna skupina	50	2677	-1,24	0,215
	Majke	Ispitanici	103			
		Referentna skupina	47	3259	3,40	0,001
MI	Novorođenčad	Ispitanici	127			
		Referentna skupina	50	4802	5,86	< 0,001
	Majke	Ispitanici	103			
		Referentna skupina	47	1445	-3,95	< 0,001

MI – metilacijski potencijal, N – broj ispitanika, W – test statistika Wilcoxonovog testa sume rangova, Z – standardizirana test statistika Wilcoxonovog testa sume rangova, p – razina značajnosti

Slika 16. Koncentracija AdoMet-a (A), AdoHcy-a (B) te metilacijski potencijal (MI) (C) za novorođenčad, uz označenu statističku značajnost između ispitivane i referentne skupine. Statistički značajne razlike između skupina su označene p-vrijednostima izračunanim Wilcoxonovim testom sume rangova

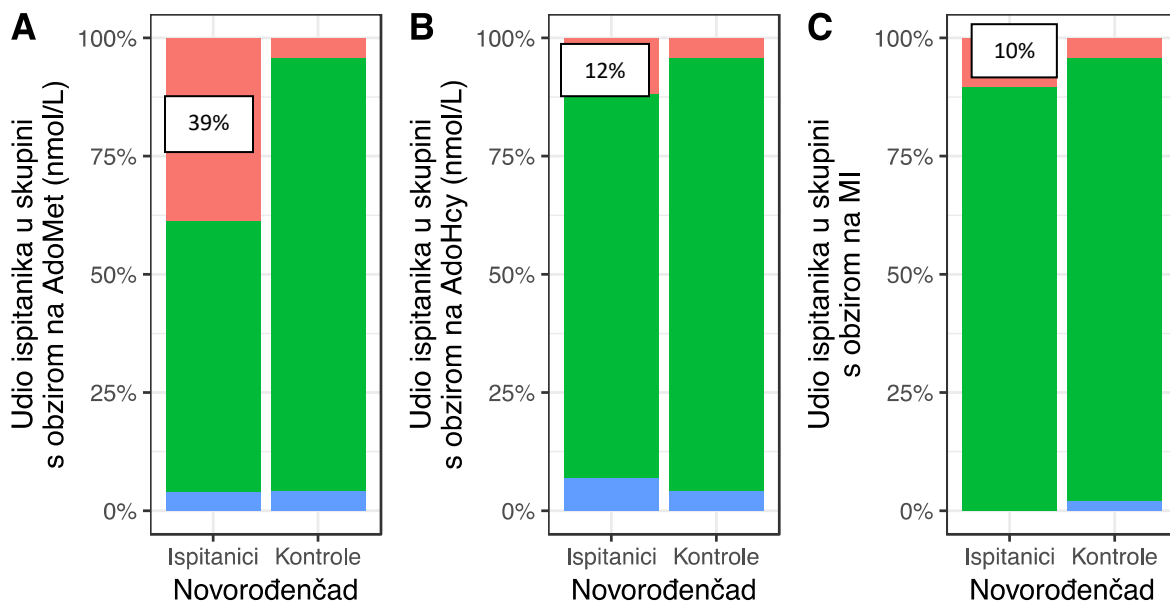


Tablica 9. Broj ispitanika s vrijednostima iznad, unutar i ispod referentnog intervala po skupinama – omjer izgleda

		Broj ispitanika (%) s obzirom na granice referentnog intervala								
		Ukupno	Ispod			Između	Iznad			
		<i>N</i> (%)	<i>N</i> (%)	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i>	<i>N</i> (%)	<i>N</i> (%)	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	<i>P</i>	
AdoMert	Novorođenčad	I	127	5 (4)	0,94	1,000	73 (57)	49 (39)	14,29	< 0,001
		R	50	2 (4)	(0,15 - 10,23)		44 (92)	2 (4)	(3,46 - 127,15)	
	Majke	I	103	11 (11)	2,68	0,347	83 (81)	9 (9)	2,14	0,504
		R	47	2 (4)	(0,55 - 25,85)		43 (92)	2 (4)	(0,42 - 21,21)	
AdoHcy	Novorođenčad	I	127	9 (7)	1,75	0,729	103 (81)	15 (12)	3,06	0,160
		R	50	2 (4)	(0,34 - 17,25)		44 (92)	2 (4)	(0,67 - 28,7)	
	Majke	I	103	2 (2)	0,45	0,590	67 (65)	34 (33)	10,96	< 0,001
		R	47	2 (4)	(0,03 - 6,36)		43 (92)	2 (4)	(2,59 - 98,75)	
MI	Novorođenčad	I	127	0 (0)	0,00	0,274	114 (90)	13 (10)	2,61	0,243
		R	50	1 (2)	(0,00 - 14,74)		45 (94)	2 (4)	(0,56 - 24,74)	
	Majke	I	103	40 (39)	14,10	< 0,001	61 (59)	2 (2)	0,45	0,590
		R	47	2 (4)	(3,36 - 126,71)		43 (92)	2 (4)	(0,03 - 6,36)	

I – ispitivana skupina, R – referentna skupina, N – apsolutna frekvencija, OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti, MI – metilacijski potencijal, p – razina značajnosti

Slika 17. Grafički prikaz udjela ispitanika novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s obzirom na referentne vrijednosti AdoMet-a (A), AdoHcy-a (B) i metilacijskog potencijala (MI) (C). Plavom je bojom prikazan udio ispitanika s vrijednosti manjom od donje referentne vrijednosti, zelenom bojom udio ispitanika unutar referentnog intervala te crvenom bojom udio ispitanika iznad gornje referentne vrijednosti. Fisher-Freeman-Haltonov test, $P < 0.001$



Između ispitivane i referentne skupine postoji statistički značajna razlika u koncentracijama AdoMet-a, ali ne i AdoHcy-a (Wilcoxonov test sume rangova, $P < 0.001$). Medijan za AdoMet je 1,57 puta veći u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu. Ispitanici su, kao skupina, imali veće interkvartilne raspone za izmjerene vrijednosti AdoMet-a, ali ne i AdoHcy-a u odnosu na referentnu skupinu (tablica 9, slika 16). U pojedinih ispitanika su vrijednosti oba izmjerena metabolita značajno odstupale u odnosu na referentnu skupinu, ali i na većinu ispitanika u ispitivanoj skupini.

Usporedbom udjela AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala (MI) koji su odstupali od referentnog raspona za navedene analite, pokazali smo da značajan udio ispitanika u ispitivanoj skupini ima vrijednosti AdoMet-a iznad gornje granice referentnog raspona, u odnosu na referentnu skupinu (slika 17). Koncentracije AdoMet-a više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 39% (49/127), a u referentnoj skupini 4% (2/50) ispitanika

(slika 17A). Kod novorođenčadi u ispitivanoj skupini izgledi su 14,29 puta veći nego kod novorođenčadi u referentnoj skupini da će pojedino novorođenče imati povišen AdoMet u odnosu na gornju granicu referentne vrijednosti ($p < 0.001$). Koncentracije AdoHcy-a više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 12% (15/127), a u referentnoj skupini 4% (2/50) ispitanika (slika 17B). Kod novorođenčadi u ispitivanoj skupini izgledi su 3,06 puta veći nego kod novorođenčadi u referentnoj skupini da će pojedino novorođenče imati povišen AdoHcy u odnosu na gornju granicu referentne vrijednosti ($p = 0.16$). Referentni rasponi u novorođenačkoj dobi su: za AdoMet 129,4-321,5 nmol/L, za AdoHcy 28,35-126,65 nmol/L i za MI 1,4 -7,26 (više u odlomku 4.2.2.5.)

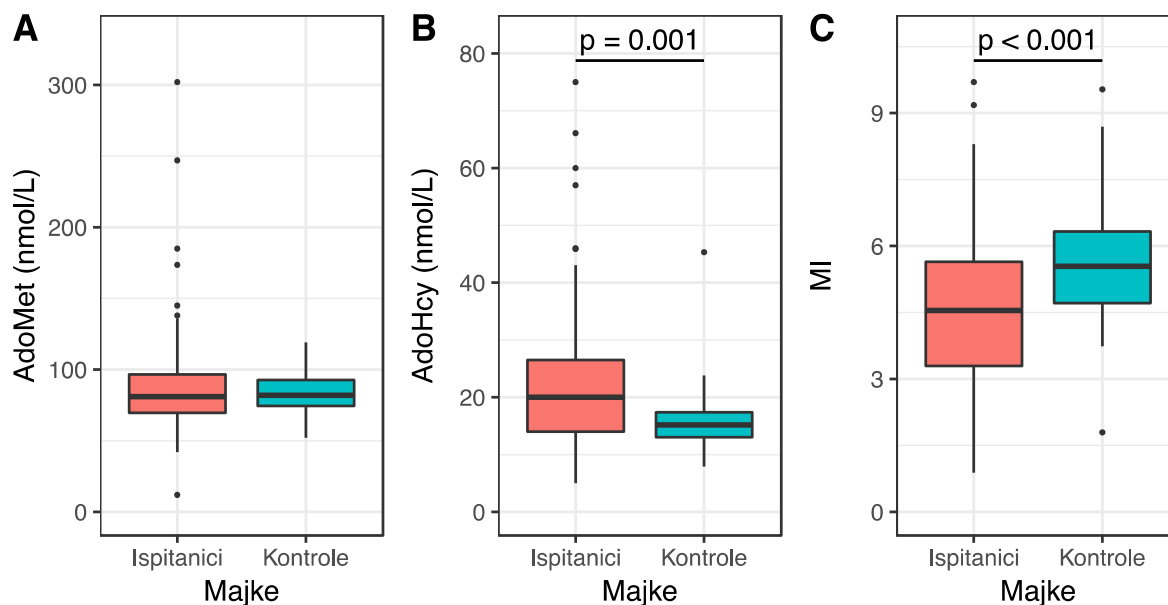
Vrijednosti metilacijskog potencijala su statistički značajno veće u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu, prvenstveno kao posljedica statistički značajno višeg AdoMet-a (slika 17C). Ispitivana skupina je imala veći raspon metilacijskog potencijala, jednako kao i raspone koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a, u odnosu na referentnu skupinu. Vrijednosti metilacijskog potencijala u pojedinim ispitanika su značajno odstupale te je metilacijski potencijal viši od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini imalo 10% (13/127), a u referentnoj skupini 4% (2/50) ispitanika (slika 17C). Izgledi su 2,61 puta veći u novorođenčadi u ispitivanoj skupini nego u novorođenčadi u referentnoj skupini da će pojedino novorođenče imati povišen MI u odnosu na gornju granicu referentne vrijednosti ($p = 0.243$).

U pet ispitanika izmjeren je AdoMet dvostruko i više veći (od 706 do 1050 nmol/L) od maksimalnog izmjerenog u novorođenčadi u referentnoj skupini s tim da je koncentracija AdoHcy-a u plazmi tih ispitanika bila 1,1 do 1,7 puta veća (140 do 225 nmol/L) nego maksimalne koncentracije izmjerene u novorođenčadi u referentnoj skupini. Omjer AdoMet-a i AdoHcy-a u ovih ispitanika nije odstupao od referentnih vrijednosti (3,4 do 7,4). U ispitanice s najvišim koncentracijama AdoMet-a (1050 nmol/L) i AdoHcy-a (225 nmol/L) dodatnom je obradom ustanovljeno da ima uredne koncentracije homocisteina za dob (5,3 μ mol/L) te uredne koncentracije vitamina B₁₂ (331 pmol/L) i folne kiseline (16,4 nmol/L).

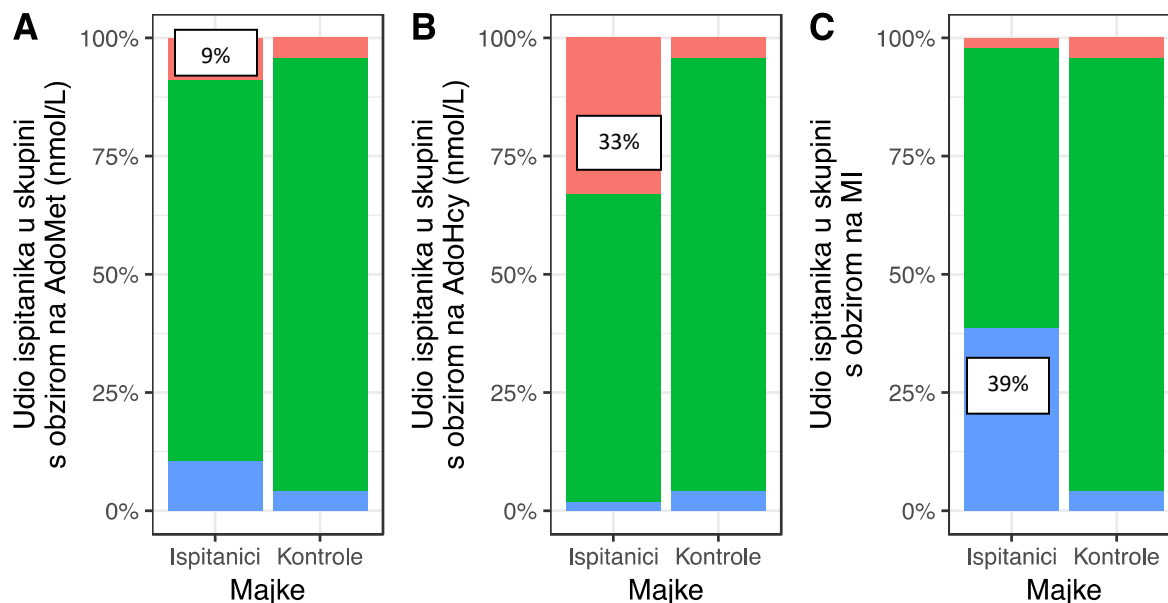
5.1.2. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u plazmi majki novorođenčadi s prirodnom srčanom greškom i u referentnoj skupini

Izmjerali smo koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi ranije opisanom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemskim spektrometrom masa u 103 majke novorođenčadi s prirodnom srčanom greškom uključenih u istraživanje. Podatke dobivene mjerenjem usporedili smo s vrijednostima u ispitanika referentne skupine (tablica 7 i 8).

Slika 18. Prikaz koncentracija AdoMet-a (nmol/L), AdoHcy-a (nmol/L) i metilacijskog potencijala (MI) u majki novorođenčadi s prirodnom srčanom greškom u odnosu na referentne vrijednosti, uz označenu statističku značajnost između ispitanice i referentne skupine. Statistički značajne razlike između skupina su označene p-vrijednostima izračunanim Wilcoxonovim testom sume rangova



Slika 19. Grafički prikaz udjela ispitanica majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s obzirom na referentne vrijednosti AdoMet-a (A), AdoHcy-a (B) i metilacijskog potencijala (MI) (C). Prikazan je udio ispitanica s vrijednosti manjom od donje referentne vrijednosti plavom, unutar referentnog intervala zelenom te iznad gornje referentne vrijednosti crvenom bojom. Fisher-Freeman-Haltonov test, $P < 0.001$.



Između ispitivane i referentne skupine postoji statistički značajna razlika u koncentracijama AdoHcy-a, ali ne i AdoMet-a (Wilcoxonov test sume rangova, $P < 0.001$). Ispitanice su, kao skupina, imale veće interkvartilne raspone za izmjerene vrijednosti AdoHcy-a i AdoMet-a u odnosu na referentnu skupinu (tablica 9, slika 18). U pojedinih ispitanika su vrijednosti oba izmjerena metabolita značajno odstupale u odnosu na referentnu skupinu, ali i na većinu ispitanika u ispitivanoj skupini.

Usporedbom udjela AdoMet-a i AdoHcy-a koji su odstupali od referentnog raspona za navedene analite, pokazali smo da značajan udio ispitanica u ispitivanoj skupini ima vrijednosti AdoHcy-a iznad gornje granice referentnog raspona, u odnosu na referentnu skupinu (slika 19B). Koncentracije AdoHcy-a više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 33% (34/103), a u referentnoj skupini 4% (2/47) ispitanica (slika 19B). Koncentracije AdoMet-a više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 9% (10/103),

a u referentnoj skupini 4% (2/47) ispitanica (slika 19A). Referentni rasponi u žena reproduktivne dobi su: za AdoMet 10,16 do 21,84 nmol/L, za AdoHcy 64 – 111,28 nmol/L (više u odlomku 4.2.2.5).

Postoji i statistički značajna razlika u vrijednostima metilacijskog potencijala između ispitanica i referentne skupine (slika 19C) - ispitanice su imale statistički značajno niži metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu. Veći raspon metilacijskog potencijala je imala ispitivana skupina, jednako kao i raspone koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a. Vrijednosti metilacijskog potencijala u pojedinih ispitanica su značajno odstupale. Čak 39% (40/103) ispitanica je imalo metilacijski potencijal niži od 5. centile referentne skupine.

Jedna je ispitanica imala koncentraciju AdoHcy-a u plazmi višu od koncentracije AdoMet-a (AdoMet 58,5 nmol/L, AdoHcy 66,09 nmol/L) te posljedično metilacijski potencijal niži od 1 (0,89). Čak sedam ispitanica (6,7%) imalo je metilacijski potencijal dvostruko niži od 5. centile referentne skupine, s tim da je u tih ispitanica koncentracija AdoHcy-a bila dvostruko i više veća od 95. centile za referentnu skupinu. Koncentracije AdoHcy-a dvostruko veće od 95. centile referentne skupine imalo je osam ispitanica (44 do 75 nmol/L). U tih ispitanica koncentracije AdoMet-a varirale su od onih istovjetnih medijanu referentne skupine do trostruko većih od 95. centile referentne skupine (85 do 302 nmol/L), dok je metilacijski potencijal iznosio od 1,84 (dvostruko niži od 5. centile referentne skupine) do 5,03 (blizu medijana za MI za referentnu skupinu).

5.1.3. Međusobni odnos koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom

Analizirali smo međusobne odnose AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala (MI) u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom.

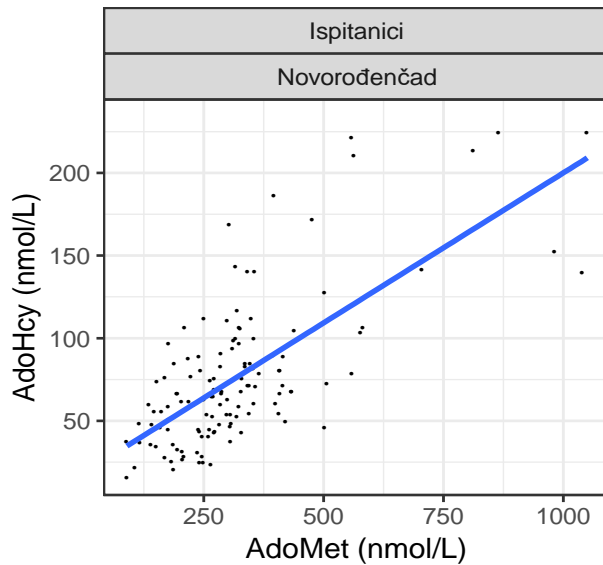
Tablica 10. Povezanost koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a, AdoMet-a i metilacijskog potencijala te AdoHcy -a i metilacijskog potencijala u ispitivanima i referentnim skupinama

Povezanost	Skupina	N	ρ	Snaga korelacije	S	p	
AdoHcy – AdoMet	Novorođenčad	Ispitanici	127	0,6165	Srednja	130926	< 0,001
	Majke		103	0,3875	Slaba	111533	< 0,001
	Novorođenčad	Referentna	50	0,1613		15452	0,273
	Majke	skupina	47	0,3424	Slaba	11374	0,019
MI - AdoMet	Novorođenčad	Ispitanici	127	0,2155	Slaba	267809	0,015
	Majke		103	0,2284	Slaba	140519	0,020
	Novorođenčad	Referentna	50	0,4532	Srednja	10074	0,001
	Majke	skupina	47	0,3244	Slaba	11686	0,027
MI - AdoHcy	Novorođenčad	Ispitanici	127	-0,5670	Srednja	534944	< 0,001
	Majke		103	-0,7308	Jaka	315190	< 0,001
	Novorođenčad	Referentna	50	-0,7673	Jaka	32560	< 0,001
	Majke	skupina	47	-0,7168	Jaka	29694	< 0,001

ρ - Spearmanov korelacijski koeficijent, S - zbroj kvadrata razlike između rangova, MI- metilacijski potencijal, N- broj ispitanika

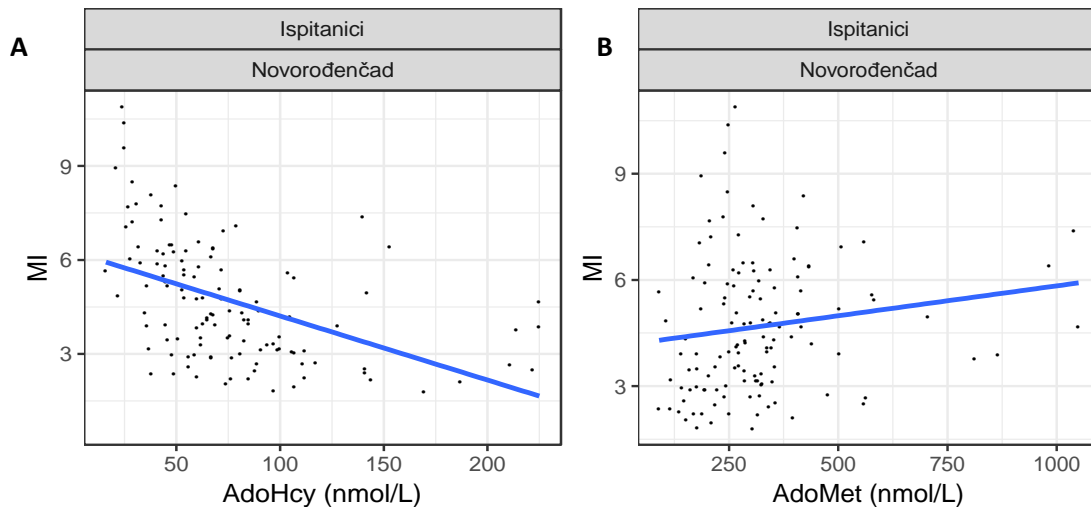
Rezultati prikazani u tablici 10 upućuju na statistički značajnu korelaciju gotovo među svim parametrima u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama. Očekivano, međusobna ovisnost AdoHcy-a i AdoMet-a (slika 20) je statistički značajna. Pozitivna korelacija AdoMet-a i AdoHcy-a upućuje na primjerenu stabilnost uzoraka tj. ne upućuje na neenzimatski put razgradnje AdoMet-a. Postoji statistički značajna povezanost metilacijskog potencijala s AdoHcy-em (slika 21a) čiji porast korelira s padom vrijednosti metilacijskog potencijala. Postoji i slaba, ali ipak statistički značajna korelacija AdoMet-a i metilacijskog potencijala - što je AdoMet viši, to je metilacijski potencijal viši (slika 21b).

Slika 20. Korelacija AdoMet-a i AdoHcy-a u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom: $\rho=0,6165$, $p<0,001$. Koncentracije dvaju analita međusobno srednje jako koreliraju i raspodjela je gotovo linearna. Puna linija: regresijski pravac



Slika 21a. Korelacija AdoHcy-a s metilacijskim potencijalom je srednje jaka i raspodjela je gotovo linearna; $\rho=-0,521$, $P<0,001$. Puna linija: regresijski pravac

Slika 21b. Postoji slaba, ali statistički značajna korelacija AdoMet-a s metilacijskim potencijalom; $\rho=-0,2155$, $P=0,015$. Puna linija: regresijski pravac

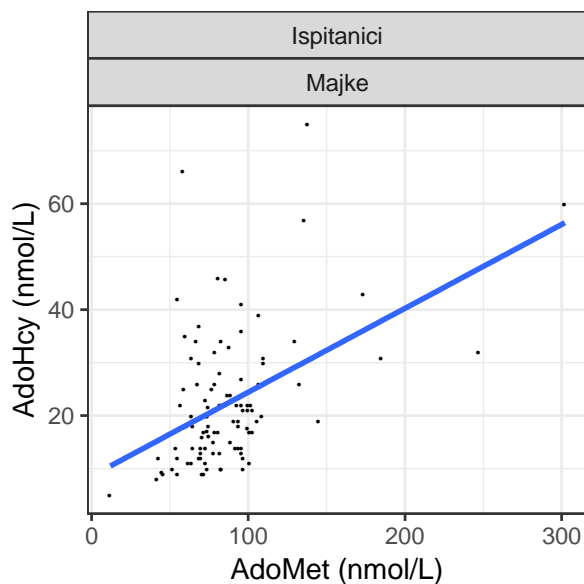


5.1.4. Međusobni odnos koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom

Analizirali smo međusobne odnose AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala (MI) u skupini majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom (tablica 10).

Rezultati prikazani u tablici 10 upućuju na statistički značajnu korelaciju među svim parametrima. Porast AdoHcy-a korelira s porastom AdoMet-a (slika 22). Postoji statistički značajna povezanost AdoHcy-a i metilacijskog potencijala (slika 23a); porast AdoHcy-a značajno korelira s padom vrijednosti metilacijskog potencijala, čak i bolje u odnosu na ispitivanu skupinu novorođenčadi. Postoji statistički značajna korelacija i između AdoMet-a i metilacijskog potencijala - porast AdoMet-a prati porast metilacijskog potencijala (slika 23b).

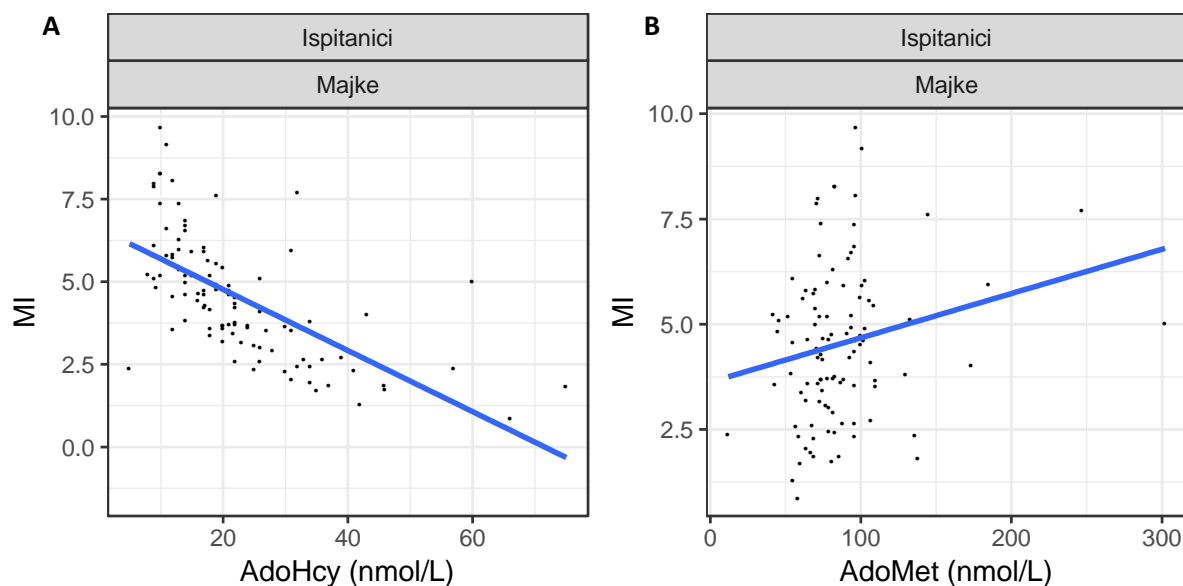
Slika 22. Korelacija AdoMet-a i AdoHcy-a u ispitivanoj skupini majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom: $\rho=0,3875$, $P<0,001$. Koncentracije dvaju analita međusobno koreliraju, ali slabo. Puna linija: regresijski pravac



Slika 23. A. Korelacija AdoHcy-a s metilacijskim potencijalom u majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom je jaka i raspodjela je gotovo linearna; $\rho=-0,7308$, $P<0,001$.

Puna linija: regresijski pravac

B. Postoji slaba, ali značajna korelacija AdoMet-a s metilacijskim potencijalom u majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom, $\rho=0,2284$, $P=0,02$. Puna linija: regresijski pravac



5.1.5. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom u odnosu na dob ispitanika

Već tijekom određivanja referentnih vrijednosti koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i njihovog omjera u novorođenčadi bilo je uočeno postojanje statistički značajne razlike između novorođenčadi i odraslih osoba (tablica 10).

Tablica 11. Prikaz referentne skupine novorođenčadi i žena reproduktivne dobi u odnosu na analizirane varijable: Wilcoxonov test sume rangova

	Skupina	N	Min	5. centila	25. centila	Medijan	75. centila	95. centila	Max
AdoMet	Novorođenčad	50	74,0	132,1	153,8	184,0	221,3	284,7	379,0
	Žene	47	52,0	64,0	74,4	81,9	92,7	111,3	119,1
AdoHcy	Novorođenčad	50	24,00	30,70	53,00	81,50	95,25	121,85	129,00
	Žene	47	7,93	10,12	13,03	15,18	17,38	21,84	45,32
MI	Novorođenčad	50	0,800	1,400	1,900	2,350	3,512	6,545	8,500
	Žene	47	1,796	3,800	4,711	5,541	6,330	8,306	9,536

MI – metilacijski potencijal, N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, Max – najveća vrijednost

Iz tablice 10. vidljivo je da su koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a statistički značajno više novorođenačkoj dobi u odnosu na odrasle žene u reproduktivnoj dobi. Medijan koncentracije AdoMet-a je oko 2,2 puta veći u novorođenačkoj dobi u odnosu na onaj u žena reproduktivne dobi, a medijan koncentracije AdoHcy-a oko 5,3 puta veći. Posljedično je i metilacijski potencijal oko 2,3 puta manji u novorođenačkoj dobi u odnosu na metilacijski potencijal u odrasloj dobi.

Također je unutar referentne skupine novorođenčadi moguće vidjeti ovisnost koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala o životnoj dobi. Postoji statistički značajna korelacija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u odnosu na dane života - što je novorođenče mlađe to su koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a više, a metilacijski potencijal niži (slika 24). Učinili smo i regresiju kvantila u skupini ispitivane novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom (tablica 12, slika 24). U ispitanika također postoji statistički značajna korelacija između AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala te dana života.

Tablica 12. Regresija 5., 50. (medijan) i 95. centila koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijski potencijal (MI) u ovisnosti o dobi

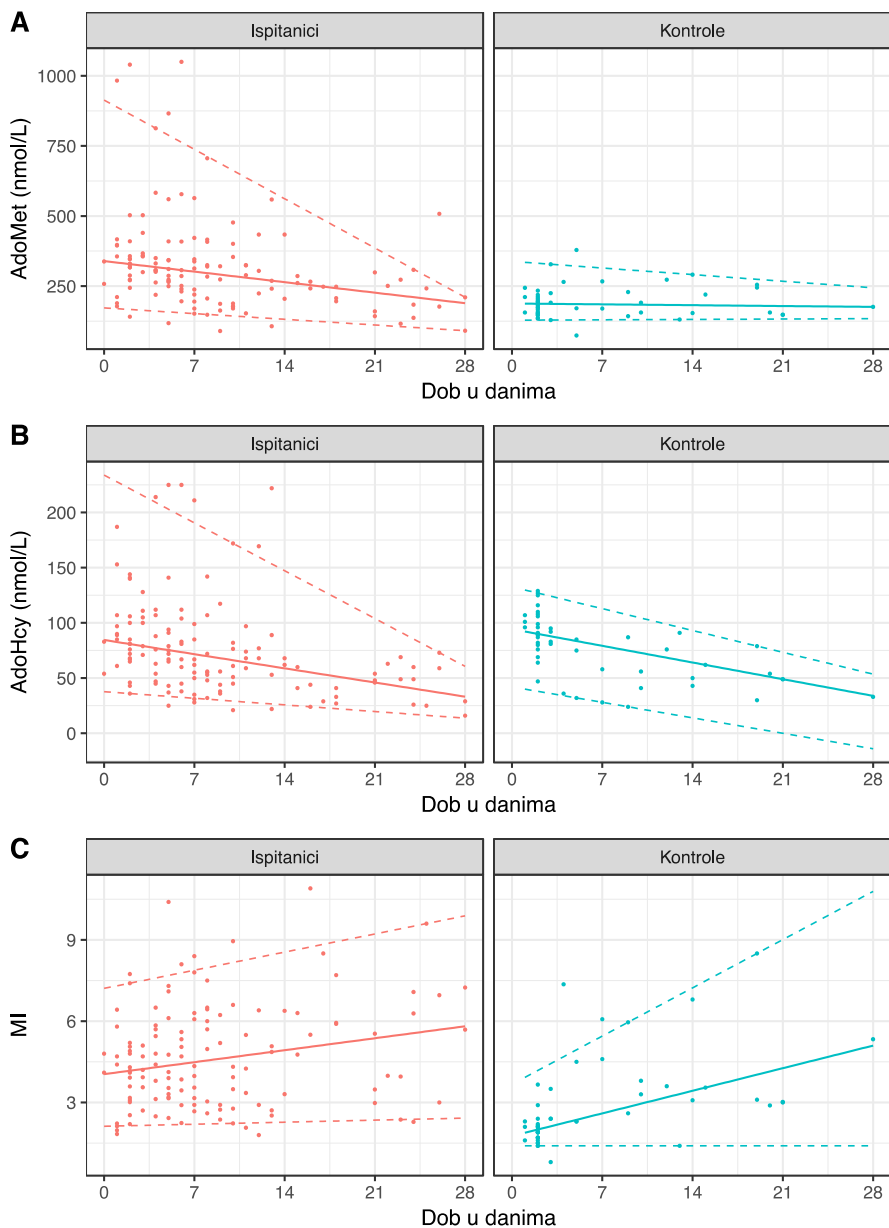
	<i>Centila</i>	<i>Koeficijent</i>	<i>b</i>	<i>SE</i>	<i>T</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet</i>	5.	(Odsječak)	172,3	20,2	8,52	<0,001
		Kontrole	-43,9	32,5	-1,35	0,179
		Dob (Ispitanici) / dan	-2,9	1,5	-1,98	0,049
		Dob (Kontrole) / dan	0,2	1,5	0,13	0,895
	50.	(Odsječak)	339,2	13,8	24,55	<0,001
		Kontrole	-151,3	18,0	-8,41	<0,001
		Dob (Ispitanici) / dan	-5,4	1,2	-4,32	<0,001
		Dob (Kontrole) / dan	-0,4	1,9	-0,23	0,821
	95.	(Odsječak)	913,5	166,6	5,48	<0,001
		Kontrole	-575,4	184,9	-3,11	0,002
		Dob (Ispitanici) / dan	-25,1	10,0	-2,52	0,013
		Dob (Kontrole) / dan	-3,36	5,41	-0,62	0,535
<i>AdoHcy</i>	5.	(Odsječak)	37,71	5,49	6,88	<0,001
		Kontrole	4,29	14,75	0,29	0,772
		Dob (Ispitanici) / dan	-0,86	0,54	-1,58	0,116
		Dob (Kontrole) / dan	-2,00	1,81	-1,11	0,270
	50.	(Odsječak)	84,50	4,50	18,77	<0,001
		Kontrole	9,82	5,76	1,70	0,090
		Dob (Ispitanici) / dan	-1,83	0,41	-4,42	<0,001
		Dob (Kontrole) / dan	-2,16	0,50	-4,28	<0,001
	95.	(Odsječak)	233,88	39,69	5,89	<0,001
		Dob (Kontrole) / dan	-101,23	40,54	-2,50	0,013
		(Odsječak)	-6,19	3,37	-1,84	0,068
		Dob (Kontrole) / dan	-2,82	0,57	-4,92	<0,001
<i>MI</i>	5.	(Odsječak)	2,120	0,157	13,50	<0,001
		Kontrole	-0,720	0,380	-1,89	0,060
		Dob (Ispitanici) / dan	0,011	0,017	0,64	0,526
		Dob (Kontrole) / dan	<0,001	0,044	0,00	1,000
	50.	(Odsječak)	4,043	0,298	13,58	<0,001
		Kontrole	-2,281	0,332	-6,87	<0,001
		Dob (Ispitanici) / dan	0,063	0,042	1,50	0,135
		Dob (Kontrole) / dan	0,119	0,037	3,22	0,002
	95.	(Odsječak)	7,209	0,644	11,19	<0,001
		Kontrole	-3,538	1,902	-1,86	0,065
		Dob (Ispitanici) / dan	0,096	0,091	1,05	0,295
		Dob (Kontrole) / dan	0,254	0,156	1,63	0,106

b – iznos regresijskog koeficijenta, SE – standardna pogreška, T – test statistika, MI- metilacijski potencijal, odsječak - procjenjeni medijan u dobi od 0 dana

Iz navedene tablice vidljivo je da se 5. centila ispitivane skupine za AdoMet u prva četiri tjedna života smanjuje za $2,9 \pm 1,5$ nmol/L dnevno, a 95. centila za $25,1 \pm 10$ nmol/L dnevno. Također je značajno da je u trenutku rođenja medijan AdoMet-a u ispitivanoj skupini za 151 ± 18

nmol/L veći od referentne skupine. 5. centila ispitivane skupine za AdoHcy se smanjuje u prva četiri tjedna života za $0,86 \pm 0,54$ nmol/L dnevno, a 95. centila za $6,19 \pm 3,37$ nmol/L dnevno.

Slika 24. Regresija 5., 50. (medijan) i 95. centila koncentracije S-adenozilmetionina (AdoMet-a), S-adenozilhomocisteina (AdoHcy-a) te metilacijskog potencijala (MI) u ovisnosti o dobi u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom. Puna linija prikazuje medijan, gornja iscrtana linija prikazuje 95., a donja 5. centilu



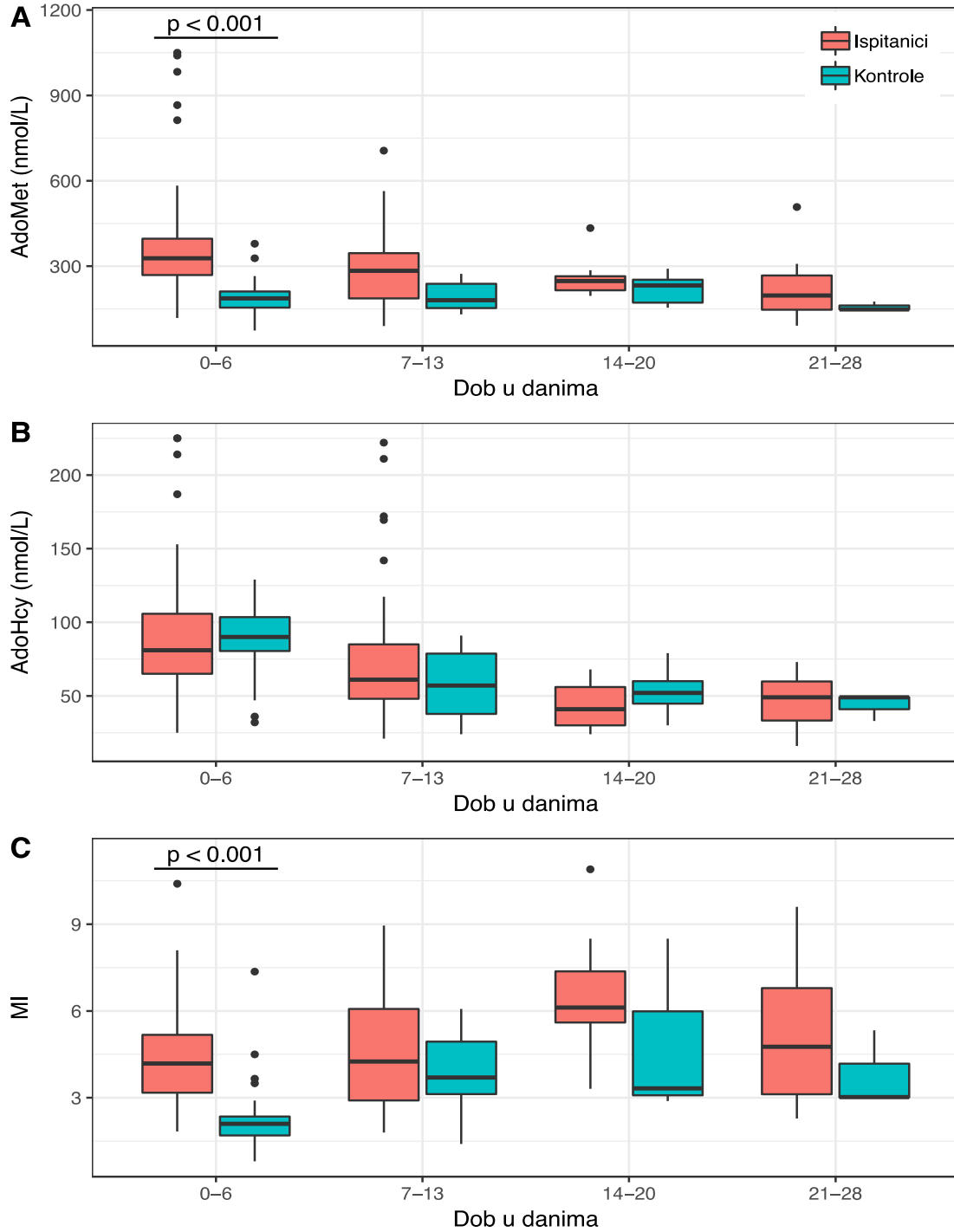
Kako bi se dodatno procijenila eventualna ovisnost koncentracije S-adenozilmetionina (AdoMet-a), S-adenozilhomocisteina (AdoHcy-a) i metilacijskog potencijala o dobi života, podijelili smo skupinu ispitanika i referentnu skupinu na četiri dobne skupine (prvi, drugi, treći i četvrti tjedan života) te usporedili dobivene rezultate mjerenja u ispitivanoj skupini s rezultatima referentne skupine (tablica 13, slika 25).

Tablica 13. Razlika koncentracija AdoMet-a (nmol/l), AdoHcy-a (nmol/L) i metilacijskog potencijala (MI) između ispitivane skupine novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i referentne skupine za različite dobne skupine. Vrijednost p je korigirana na višestruko testiranje Bonferronijevom metodom

	<i>Dob</i> (<i>tjedani</i>)	<i>Skupina</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5.</i> <i>centila</i>	<i>25.</i> <i>centila</i>	<i>M</i>	<i>75.</i> <i>centila</i>	<i>95.</i> <i>centila</i>	<i>Max</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet</i>	1	I	62	118,0	189,4	268,8	328,0	396,5	863,4	1050,0	1735,0	<0,001
		R	31	74,0	131,5	154,5	187,0	211,5	296,5	379,0		
	2	I	41	90,0	148,0	187,0	284,0	346,0	559,0	706,0	247,5	0,099
		R	8	131,0	135,2	152,8	180,5	238,5	270,9	273,0		
	3	I	10	196,0	200,1	215,8	248,0	264,8	367,4	434,0	38,0	1,000
		R	6	154,0	154,5	172,0	232,5	252,5	282,0	291,0		
	4	I	14	91,0	107,3	147,3	197,0	267,5	378,0	508,0	29,0	1,000
		R	3	148,0	148,0	148,0	148,0	162,0	173,2	176,0		
<i>AdoHcy</i>	1	I	62	25,00	38,25	65,00	81,00	105,75	185,30	225,00	823,5	1,000
		R	31	32,00	41,50	80,50	90,00	103,50	126,00	129,00		
	2	I	41	21,00	28,00	48,00	61,00	85,00	172,00	222,00	188,5	1,000
		R	8	24,00	25,40	37,75	57,00	78,75	89,60	91,00		
	3	I	10	24,00	25,35	30,00	41,00	56,00	65,30	68,00	18,5	0,929
		R	6	30,00	33,25	44,75	52,00	60,00	74,75	79,00		
	4	I	14	16,00	21,85	33,25	49,00	59,75	70,40	73,00	24,0	1,000
		R	3	33,00	34,60	41,00	49,00	49,00	49,00	49,00		
<i>MI</i>	1	I	62	1,835	2,202	3,175	4,185	5,175	7,395	10,400	1723,5	<0,001
		R	31	0,800	1,400	1,700	2,100	2,350	4,080	7,361		
	2	I	41	1,797	2,227	2,909	4,250	6,071	7,800	8,952	189,0	1,000
		R	8	1,400	1,820	3,125	3,700	4,940	6,032	6,071		
	3	I	10	3,306	3,964	5,600	6,120	7,371	9,820	10,900	43,5	0,633
		R	6	2,889	2,937	3,085	3,325	5,987	8,075	8,500		
	4	I	14	2,283	2,338	3,120	4,761	6,791	8,067	9,600	27,5	1,000
		R	3	3,000	3,002	3,010	3,020	4,177	5,102	5,333		

I – ispitanici, R – referentna skupina, N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, Max – najveća vrijednost, W – test statistika Wilcoxonovog testa sume rangova, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 25. Prikaz razlike u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskom potencijalu (MI) između ispitivane skupine novorođenčadi s prirodnom srčanom greškom i referentne skupine za različite dobne skupine

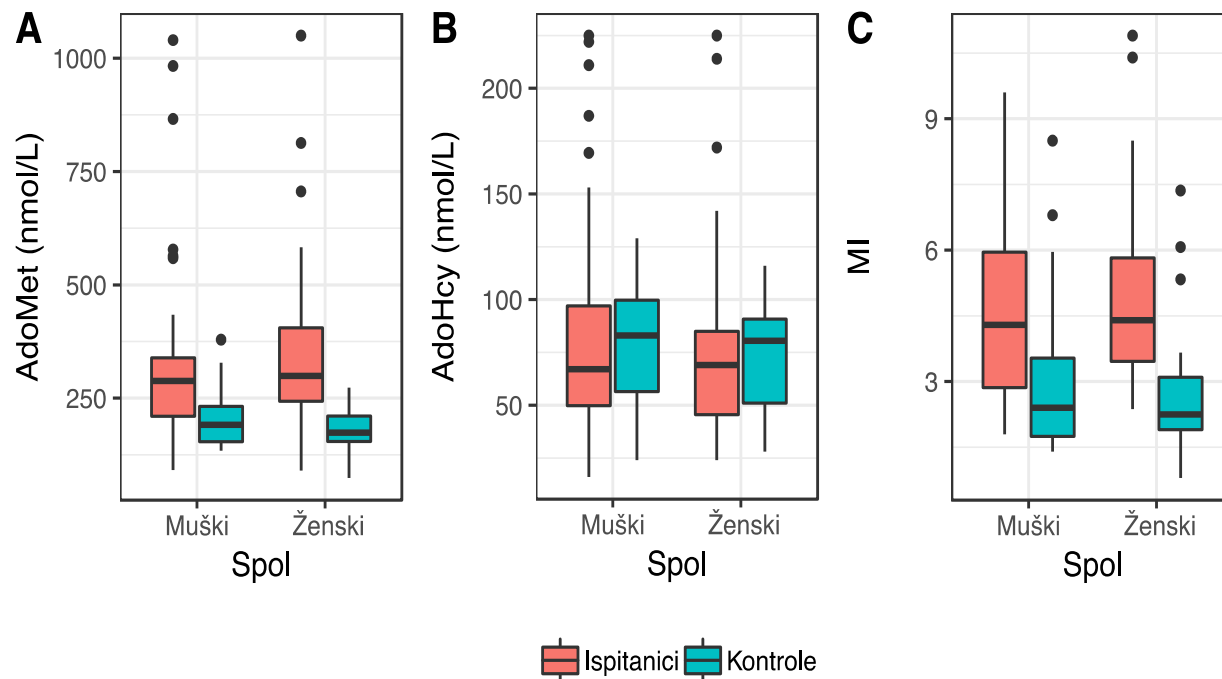


Između ispitivane i referentne skupine postoji statistički značajna razlika u koncentracijama AdoMet-a samo u prvom tjednu života, dok su koncentracije AdoMet-a u svih ostalih dobnih skupina bile više u ispitanika nego u referentnoj skupini, ali nije bilo statističke značajnosti. Što se tiče AdoHcy-a, ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama između dviju skupina neovisno o dobnj skupini. Metilacijski potencijal je također statistički značajno povećan samo u prvom tjednu života, dok je u svih ostalih dobnih skupina viši u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu, ali nije bilo statističke značajnosti. Budući da je skupina ispitanika čiji su uzorci uzeti u prvom tjednu najveća (62/127), moguće je da je to razlog zbog kojeg smo statističku značajnost uočili samo u toj skupini.

5.1.6. Usporedba S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na spol ispitanika

Provjerili smo postoje li razlike u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala s obzirom na spol ispitanika. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala prema spolu i u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i u referentnoj skupini korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova nije dokazana statistički značajna razlika (tablica 14, slika 26).

Slika 26. Prikaz razlike koncentracija AdoMet-a (A), AdoHcy-a (B) i metilacijskog potencijala (MI) (C) između ispitivane skupine novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i referentne skupine s obzirom na spol



Tablica 14. Razlika koncentracija AdoMet-a (nmol/L), AdoHcy-a (nmol/L) i metilacijskog potencijala (MI) između ispitivane skupine novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i referentne skupine s obzirom na spol

	Skupina	Spol	N	Min	5. centila	25. centila	Medijan	75. centila	95. centila	Max	W	p
AdoMet	Ispitanici	M	76	91,0	146,3	210,0	288,0	339,0	567,5	1040,0	1714,5	0,273
	Ispitanici	Ž	51	90,0	130,5	243,0	299,0	405,0	644,5	1050,0		
	Ref. skupina	M	26	134,0	144,0	153,8	191,0	231,8	318,8	379,0	335,5	0,311
	Ref. skupina	Ž	22	74,0	129,1	154,5	174,0	210,5	264,0	273,0		
AdoHcy	Ispitanici	M	76	16,00	26,50	49,75	67,00	97,00	173,83	225,00	1994	0,785
	Ispitanici	Ž	51	24,00	27,00	45,50	69,00	85,00	157,00	225,00		
	Ref. skupina	M	26	24,00	32,75	56,50	83,00	99,75	126,50	129,00	318	0,514
	Ref. skupina	Ž	22	28,00	32,05	51,00	80,50	90,75	109,45	116,00		
MI	Ispitanici	M	76	1,797	2,109	2,859	4,296	5,955	7,755	9,600	1755	0,369
	Ispitanici	Ž	51	2,367	2,841	3,462	4,400	5,822	8,300	10,900		
	Ref. skupina	M	26	1,400	1,425	1,750	2,400	3,536	6,590	8,500	305,5	0,694
	Ref. skupina	Ž	22	0,800	1,405	1,900	2,250	3,096	6,035	7,361		

N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, Max – najveća vrijednost, W – test statistika Wilcoxonovog testa sume rangova, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

5.1.7. Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini u odnosu na mortalitet

Od 127 novorođenčadi sa složenom srčanom greškom u kojih smo mjerili koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a i određivali metilacijski potencijal u 27 (21%) je nastupio smrtni ishod. Smrtni ishod je u gotovo svih ispitanika (23/27) u nastupio tijekom prve godine života, od toga u tri ispitanika u prvom tjednu nakon uzimanja uzorka krvi za analizu AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u ispitanika u kojih je nastupio smrtni ishod u odnosu na one koji su u trenutku analiziranja uzoraka bili živi, korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova dokazana je statistički značajna razlika (tablica 15, slika 27). Naime i AdoHcy i AdoMet su bili statistički

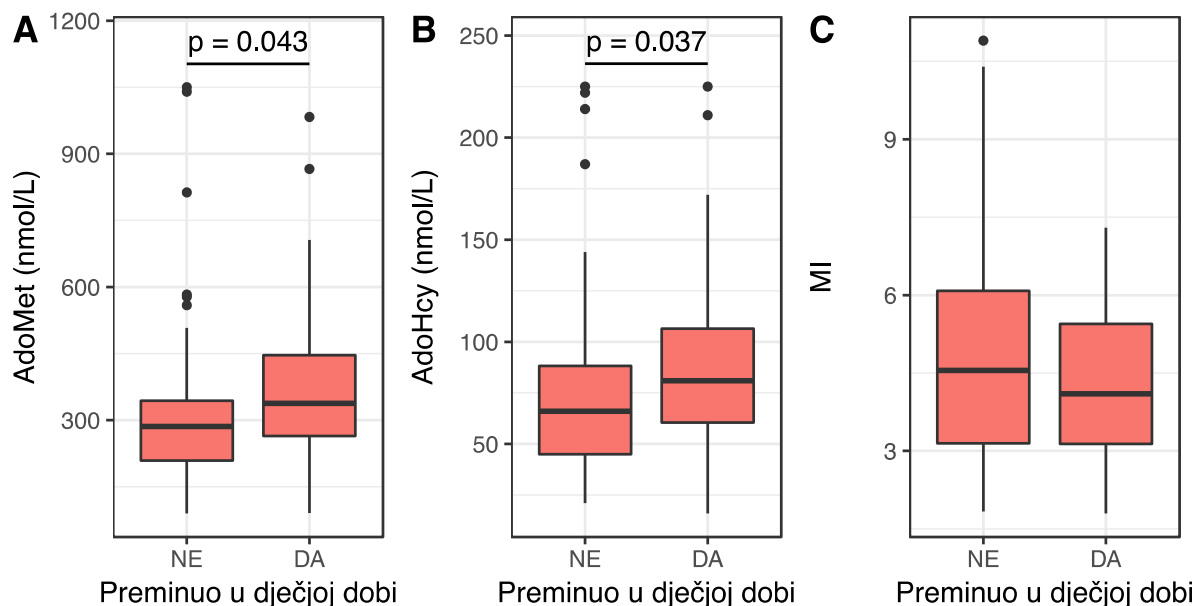
značajno viši u ispitanika u kojih je nastupio smrtni ishod u odnosu na ostatak ispitivane skupine, no nije bilo statistički značajne razlike u metilacijskom potencijalu.

Tablica 15. Razlika u koncentraciji AdoMet-a (nmol/L), AdoHcy-a (nmol/L) te metilacijskog potencijala (MI) u ispitivanoj skupini s obzirom na mortalitet

	Mortalitet	N	Min	5. centil	25. centil	M	75. centil	95. centil	Max	W	p
AdoMet	NE	100	90,0	147,8	209,3	286,0	343,8	560,0	1050,0	1006,5	0,04
	DA	27	91,0	123,7	264,5	338,0	446,5	818,0	983,0		
AdoHcy	NE	100	21,0	25,95	45,0	66,0	88,25	141,15	225,0	996,5	0,04
	DA	27	16,0	38,80	60,5	81,00	106,5	199,30	225,0		
MI	NE	100	1,8	2,227	3,15	4,55	6,082	8,405	10,90	1486,5	0,42
	DA	27	1,8	2,065	3,14	4,10	5,444	6,950	7,300		

N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, Max – najveća vrijednost, M - medijan, W – test statistika Wilcoxonovog testa sume rangova, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 27. Grafički prikaz razlike u koncentraciji AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijskog potencijala (MI) između ispitanika s obzirom na mortalitet



5.1.8. Usporedba koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanim skupinama s obzirom na etiopatogenetsku podjelu prirodnih srčanih greški po Clarku

S obzirom na etiopatogenetsku raspodjelu prirodnih srčanih grešaka prema Clarku (tablica 2) podijelili smo ispitanike u šest skupina te u one koji se ne mogu rasporediti u niti jednu skupinu prema Clarku. Od 127 ispitanika najviše je ispitanika u skupini 6 - 68 ispitanika (54%), zatim u skupini 2 - 42 ispitanika (33%). U ostalim skupinama nalazi se mali broj ispitanika - u skupini 1 šestoro novorođenčadi (5%), u skupini 3 dvoje novorođenčadi (1,6%), skupini 4 četvero novorođenčadi (3%), u skupini 5 četvero novorođenčadi (3%), dok se dvoje novorođenčadi (1,6%) nije moglo rasporediti niti u jednu skupinu prema Clarku. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala među skupinama ističe se skupina 3 (poremećaj izvanstaničnog matriksa) u kojoj se nalaze samo dva ispitanika. Ispitanici s poremećajem izvanstaničnog matriksa imali su statistički značajno više koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi u odnosu na ostale grupe, no nije bilo statistički značajne razlike u metilacijskom potencijalu. Između grupe s poremećajem migracije neuroektoderma u mezenhimalnu osnovu za srce (skupina 2) i skupine s poremećajima intrakardijalnog protoka (skupina 6) kao skupine s najvećim brojem ispitanika usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova nije dokazana statistički značajna razlika (tablica 16, slika 28).

Također smo usporedili koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal u majki koje smo podijelili u 6 skupina s obzirom na vrstu srčane greške u njihove djece podjelom po Clarku. Od 103 ispitanice najviše ih je u skupini 6 - 50 ispitanica (49%), zatim u skupini 2 - 36 ispitanica (35%). U ostalim skupinama nalazi se mali broj ispitanika - u skupini 1 šest majki (6%), u skupini 3 dvije majke (1,9%), skupini 4 četiri majke (4%) te u skupini 5 dvije majke (1,9%) dok se majka jednog novorođenčeta nije mogla rasporediti niti u jednu skupinu. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala među skupinama opet se ističe skupina 3 (poremećaj izvanstaničnog matriksa). Majke ispitanika s poremećajem izvanstaničnog matriksa imale su niži metilacijski potencijal u odnosu na ostale skupine, ali ne statistički značajno. Između skupine majki novorođenčadi s poremećajem migracije neuroektoderma u mezenhimalnu osnovu za srce (grupa 2) i skupine s poremećajima

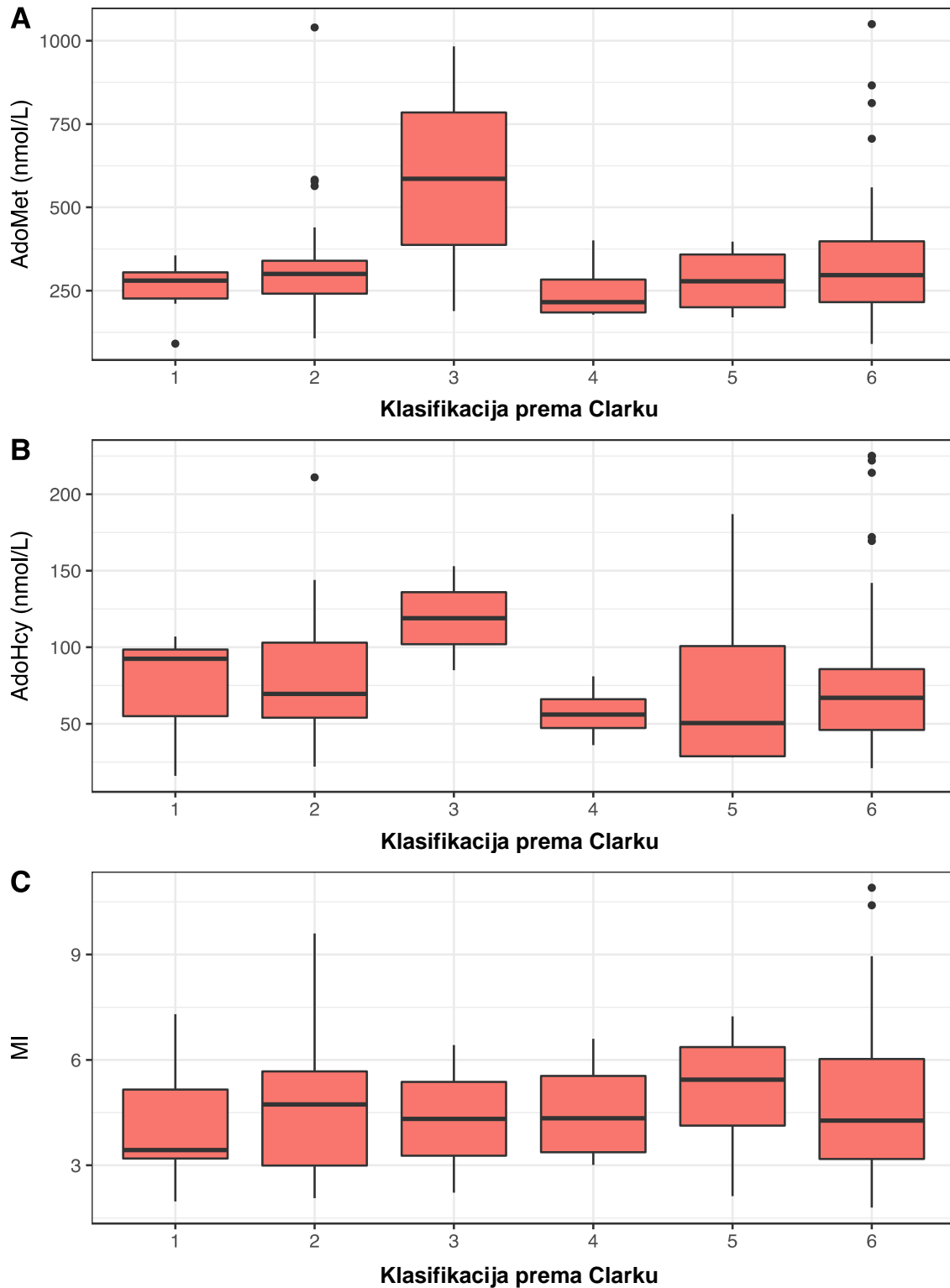
intrakardijalnog protoka (skupine 6) kao skupine s najvećim brojem ispitanika usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova nije dokazana statistički značajna razlika (tablica 17, slika 29).

Tablica 16. Koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijski potencijal (MI) s obzirom na etiopatogenetsku podjelu prirođenih srčanih greški prema Clarku

	Skupina	N	Min	5. centila	25. centila	M	75. centila	95. centila	Max	χ^2	df	p
AdoMet (nmol/L)	1	6	91,0	121,0	226,5	280,0	305,0	344,8	356,0	1,88	5	0,865
	2	42	107,0	143,5	241,3	300,5	340,0	577,3	1040,0			
	3	2	189,0	228,7	387,5	586,0	784,5	943,3	983,0			
	4	4	178,0	179,4	184,8	215,5	283,3	377,5	401,0			
	5	4	170,0	176,0	200,0	278,0	358,8	389,4	397,0			
	6	68	90,0	143,5	215,8	296,7	398,3	654,9	1050,0			
AdoHcy (nmol/L)	1	6	16,00	22,75	55,00	92,50	98,50	105,25	107,00	3,97	5	0,554
	2	42	22,00	27,10	54,00	69,50	103,0	140,95	211,00			
	3	2	85,00	88,40	102,0	119,00	136,0	149,60	153,00			
	4	4	36,00	38,25	47,25	56,00	66,00	78,00	81,00			
	5	4	28,00	28,15	28,75	50,50	100,75	169,75	187,00			
	6	68	21,00	28,10	46,00	67,00	85,75	199,30	225,00			
MI	1	6	1,972	2,267	3,193	3,434	5,156	6,897	7,300	0,78	5	0,978
	2	42	2,068	2,243	2,994	4,732	5,675	8,385	9,600			
	3	2	2,224	2,434	3,274	4,324	5,375	6,215	6,425			
	4	4	3,012	3,084	3,371	4,342	5,546	6,389	6,600			
	5	4	2,123	2,525	4,131	5,436	6,364	7,066	7,241			
	6	68	1,797	2,368	3,182	4,274	6,028	7,656	10,900			

N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 28. Utjecaj vrste srčane greške s obzirom na etiopatogenetsku podjelu prema Clarku na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijski potencijal (MI) u novorođenčadi

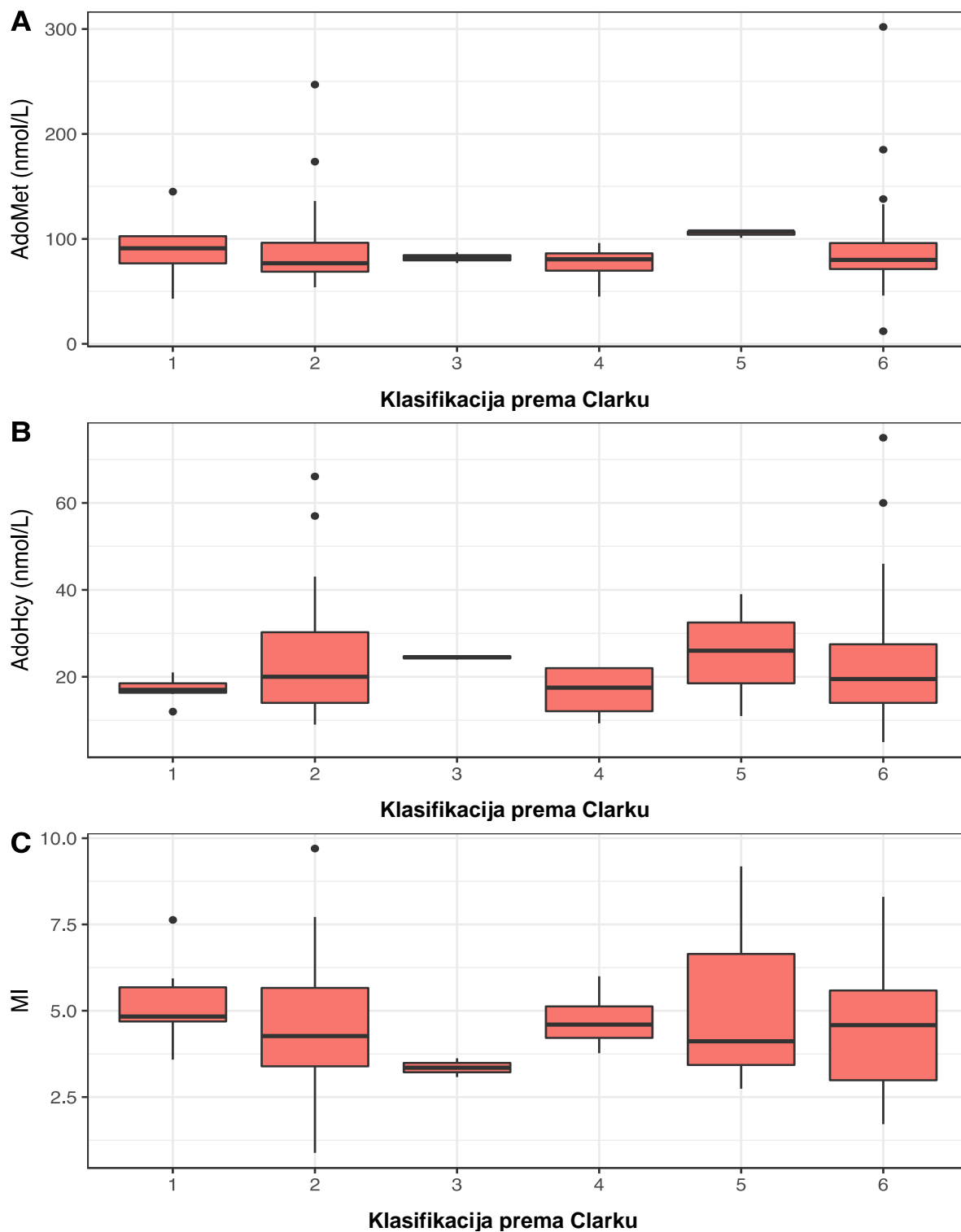


Tablica 17. Koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijski potencijal (MI) kod majki u ovisnosti o vrsti srčane greške u njihove djece

	<i>Skupina</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>Medijan</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	χ^2	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	1	6	43,0	51,0	76,6	91,0	102,5	134,5	145,0	5,42	5	0,367
	2	36	54,0	55,0	68,7	76,9	96,3	145,4	247,0			
	3	2	77,0	77,5	79,5	82,0	84,5	86,5	87,0			
	4	4	45,0	50,0	69,8	80,5	86,3	94,1	96,0			
	5	3	101,0	101,6	104,0	107,0	107,0	107,0	107,0			
	6	50	12,0	54,3	71,3	80,0	96,0	135,8	302,0			
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	1	6	12,00	13,03	16,33	17,00	18,50	20,50	21,00	3,10	5	0,684
	2	36	9,00	10,75	14,00	20,00	30,25	46,54	66,09			
	3	2	24,00	24,05	24,25	24,50	24,75	24,95	25,00			
	4	4	9,30	9,86	12,08	17,50	22,00	22,00	22,00			
	5	3	11,00	12,50	18,50	26,00	32,50	37,70	39,00			
	6	50	5,00	9,00	14,00	19,50	27,50	45,95	75,00			
<i>MI</i>	1	6	3,583	3,854	4,690	4,835	5,682	7,209	7,632	2,71	5	0,744
	2	36	0,885	1,944	3,391	4,267	5,665	7,468	9,700			
	3	2	3,080	3,107	3,216	3,353	3,489	3,598	3,625			
	4	4	3,773	3,861	4,216	4,601	5,129	5,826	6,000			
	5	3	2,744	2,881	3,429	4,115	6,649	8,675	9,182			
	6	50	1,714	1,853	2,990	4,582	5,588	8,046	8,300			

N – broj ispitanica, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 29. Koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijski potencijal (MI) kod majki u ovisnosti o vrsti srčane greške u njihove djece



5.1.9. Koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom u odnosu na prethodne pobačaje

Provjerili smo postoje li razlike u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala s obzirom na prijašnje spontane pobačaje u majki. Čak 19% majki ispitanica je prethodno imalo spontani pobačaj. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova, nije dokazana statistički značajna razlika između koncentracija navedenih metabolita niti statistički značajna razlika u metilacijskom potencijalu (tablica 18).

Tablica 18. Razlika u koncentraciji AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijskom potencijalu (MI) između ispitanica s obzirom na prisustvo prethodnih spontanih pobačaja u majke

	<i>Pobačaj</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA	20	55,0	56,9	68,5	80,0	97,0	103,4	110,0	791	0,748
	NE	83	12,0	46,6	70,0	81,0	96,5	144,3	302,0		
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	DA	20	11,00	11,95	16,75	20,00	28,50	35,60	66,09	915,5	0,478
	NE	83	5,00	9,00	13,00	20,00	26,00	45,60	75,00		
<i>MI</i>	DA	20	0,885	1,916	2,844	4,510	4,915	6,215	9,182	684,5	0,227
	NE	83	1,310	1,865	3,421	4,545	5,826	7,989	9,700		

N – broj ispitanica, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

5.1.10. Koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom u odnosu na mrtvorodne

Usporedili smo koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u majki koje su prethodno imale mrtvorodenče (2/103) s koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u ostalih majki iz ispitivane skupine. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova, nije dokazana statistički značajna razlika u tih majki u odnosu na ostale ispitanice (tablica 19).

Tablica 19. Razlika u koncentraciji AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijskom potencijalu (MI) između ispitanica s obzirom na rađanje mrtvorodenčadi

	<i>Mrtvorodeni</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA	101	12,0	52,0	69,0	79,0	97,0	138,0	302,0	130	0,496
	NE	2	83,0	83,7	86,3	89,5	92,8	95,4	96,0		
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	DA	101	5,00	9,00	14,00	20,00	27,00	45,89	75,00	72	0,495
	NE	2	10,00	10,60	13,00	16,00	19,00	21,40	22,00		
<i>MI</i>	DA	101	0,885	1,865	3,200	4,545	5,636	7,889	9,700	147,5	0,272
	NE	2	4,364	4,560	5,348	6,332	7,316	8,103	8,300		

N – broj ispitanica, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

5.1.11. Koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na postojanje drugih potomaka s prirođenom srčanom greškom

Provjerili smo postoji li povezanost koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u majki ispitanica i postojanja drugih potomaka s prirođenom srčanom greškom. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u majki ispitanica koje su imale druge potomke s prirođenom srčanom greškom (4/103) s ostalim majkama iz ispitivane skupine korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova nije dokazana statistički značajna razlika (tablica 20).

Tablica 20. Razlika u koncentraciji AdoMet-a, AdoHcy-a te metilacijskom potencijalu (MI) između ispitanica s obzirom na postojanje drugih potomaka s prirođenom srčanom greškom

	<i>Druga djeca</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA	99	12,0	51,4	69,5	81,0	96,5	136,2	247,0		
	NE	4	69,0	69,5	71,3	80,5	142,3	270,1	302,0	215,5	0,772
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	DA	99	5,00	9,00	14,00	20,00	26,50	43,34	75,00		
	NE	4	12,00	12,45	14,25	16,00	27,75	53,55	60,00	182,5	0,798
<i>MI</i>	DA	99	0,885	1,862	3,187	4,438	5,608	8,008	9,700		
	NE	4	4,235	4,355	4,834	5,392	5,796	5,906	5,933	265	0,256

Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

5.1.12. Koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom u odnosu na postojanje spontanih pobačaja, mrtvorodenih i drugih potomaka s prirodnim srčanim greškom u njihovih majki

Provjerili smo postoje li razlike u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskom potencijalu u ispitanika s obzirom na postojanje spontanih pobačaja, mrtvorodenih i drugih potomaka s prirodnim srčanim greškom u njihovih majki. Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u novorođenčadi čije su majke imale spontane pobačaje, mrtvorodenčad i/ili imale druge potomke s prirodnim srčanom greškom korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova, nije dokazana statistički značajna razlika (podaci nisu prikazani).

5.1.13. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom

Analizirali smo međusobne odnose AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom s obzirom na majčinu primjenu folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće (tablica 21 i 22, slika 30). Većina majki ispitanica nije uzimala folnu kiselinu u prvom tromjesečju (92/127). Samo 11% majki ispitanica (14/127) je počelo s primjenom folne kiseline prije začeća i primjenjivalo je tijekom prvog tromjesečja, dok je 16% (21/127) majki ispitanica uzimalo folnu kiselinu, ali neadekvatno (započele su s primjenom folne kiseline između petog i osmog tjedna trudnoće). Doza koju su uzimale također je bila različita - veliki dio njih (18/35) uzimao je doze desetorostruko veće od preporučenih za nerizičnu populaciju (5 mg). Novorođenčad majki koje nisu uzimale folnu kiselinu imala su statistički značajno viši AdoMet u odnosu na novorođenčad majki koja su uzimala folnu kiselinu. Također su imala i viši AdoHcy, mada ne statistički značajno. No, usporedbom metilacijskog potencijala nije nađena statistički značajna razlika između novorođenčadi majki koja su uzimala folnu kiselinu u prvom tromjesečju trudnoće i novorođenčadi majki koja nisu uzimala folnu kiselinu u prvom tromjesečju trudnoće.

Tablica 21. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom

	<i>Primjena</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centil</i>	<i>25. centil</i>	<i>M</i>	<i>75. centil</i>	<i>95. centil</i>	<i>Max</i>	χ^2	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet</i> (<i>nmol/L</i>)	DA	14	91,0	120,9	217,8	257,0	300,5	405,3	508,0	9,06	2	0,011
	NE	92	116,0	161,7	243,5	314,0	398,0	754,2	1050,0			
	Neadekvatna	21	90,0	107,0	170,3	219,0	308,0	409,0	559,0			
<i>AdoHcy</i> (<i>nmol/L</i>)	DA	14	16,00	24,45	47,25	63,00	82,00	103,55	112,00	1,89	2	0,389
	NE	92	21,00	27,55	50,75	68,00	97,75	178,75	225,00			
	Neadekvatna	21	22,00	26,00	36,00	62,00	83,00	111,00	222,00			
<i>MI</i>	DA	14	2,224	2,262	3,134	4,525	5,650	7,058	7,241	2,09	2	0,352
	NE	92	1,797	2,166	3,279	4,550	6,159	8,445	10,900			
	Neadekvatna	21	2,227	2,368	2,979	3,917	5,049	6,286	7,077			

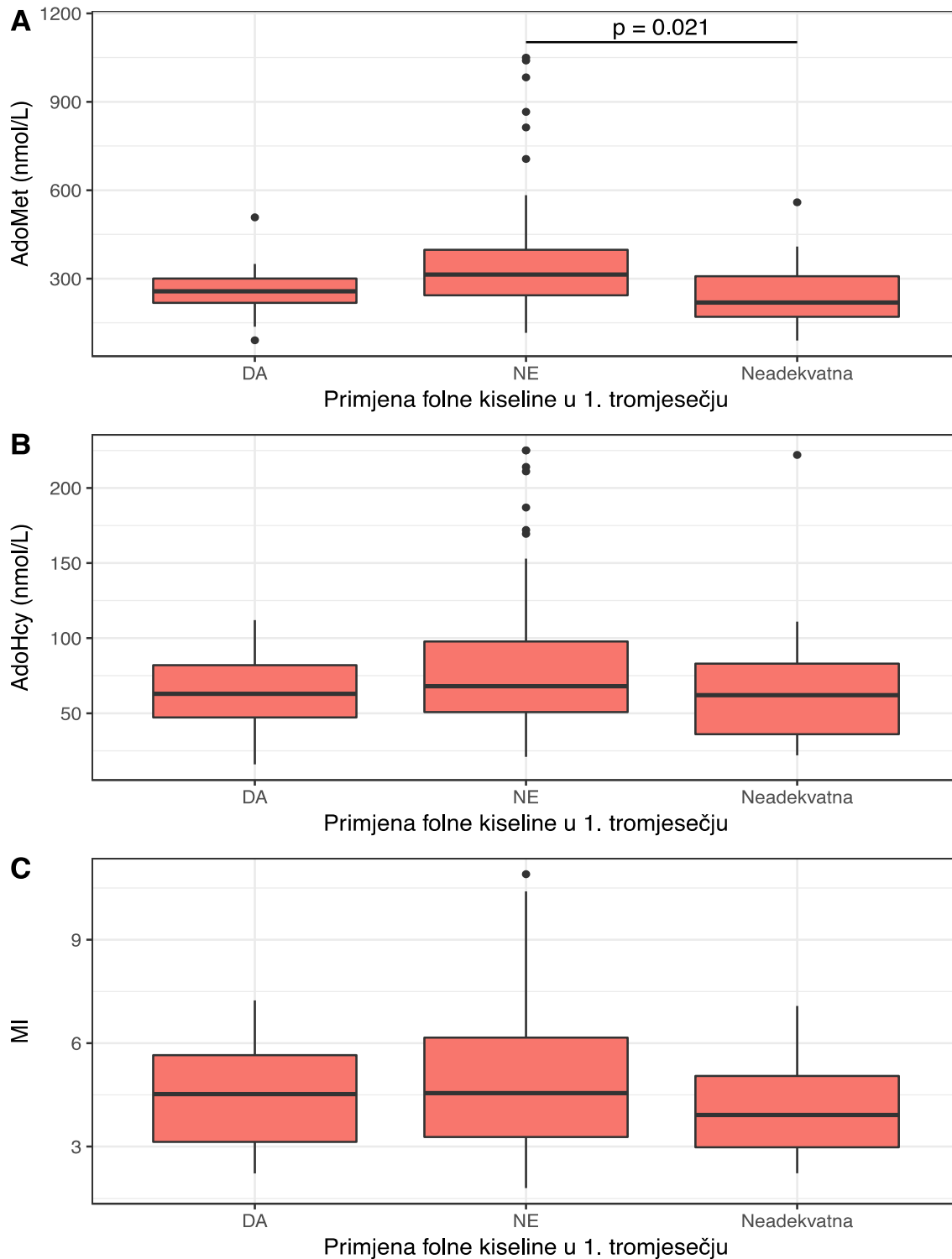
N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Tablica 22. Razlika u koncentraciji AdoMet-a između pojedinih skupina s obzirom na primjenu folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće

	<i>Usporedba grupa</i>	<i>T</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet</i> (<i>nmol/L</i>)	DA – NE	1,87	0,192
	DA – Neadekvatna	0,36	1,000
	NE – Neadekvatna	2,73	0,021

T – Conoverova test statistika, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 30. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom



5.1.14. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom

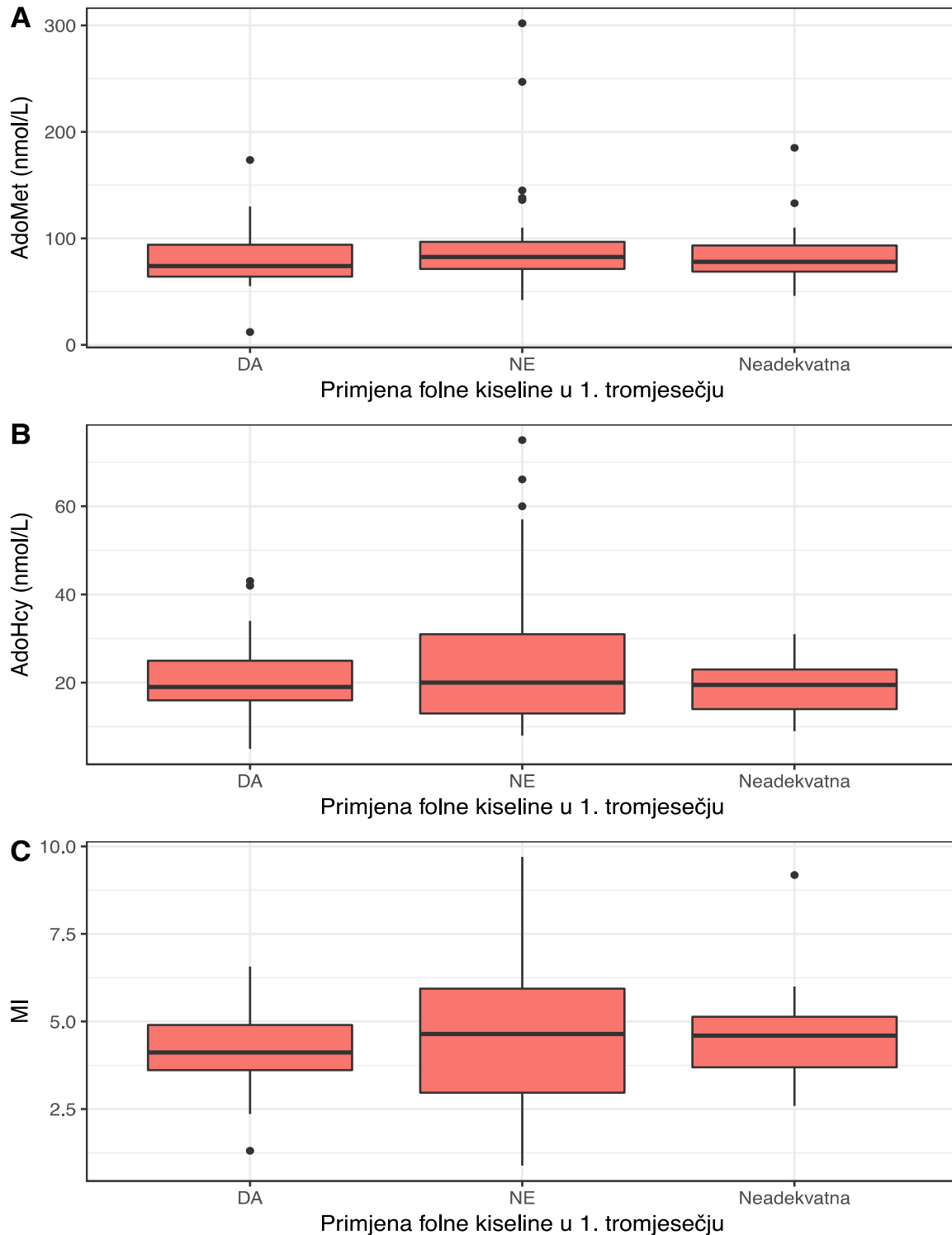
Analizirali smo i međusobne odnose AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom s obzirom na majčinu primjenu folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće (tablica 23, slika 31). Usporedbom AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala ispitivanih skupina nije nađena statistički značajna razlika između majki koja su uzimala folnu kiselinu u prvom tromjesečju trudnoće i majki koja nisu uzimala folnu kiselinu u prvom tromjesečju trudnoće.

Tablica 23. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u majki novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom

	<i>Primjena</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centil</i>	<i>Max</i>	χ^2	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA	17	12,0	46,4	64,0	74,0	94,0	138,7	173,6	0,85	2	0,652
	NE	66	42,0	52,8	71,3	82,5	96,8	137,5	302,0			
	Neadekvatna	20	46,0	53,6	68,7	78,0	93,3	135,6	185,0			
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	DA	17	5,00	10,60	16,00	19,00	25,00	42,21	43,06	0,26	2	0,879
	NE	66	8,00	9,08	13,00	20,00	31,00	54,25	75,00			
	Neadekvatna	20	9,00	10,90	14,00	9,50	22,99	30,05	31,00			
<i>MI</i>	DA	17	1,31	2,15	3,61	4,11	4,91	5,62	6,57	1,08	2	0,582
	NE	66	0,88	1,84	2,96	4,64	5,94	8,06	9,70			
	Neadekvatna	20	2,59	2,61	3,69	4,59	5,14	6,16	9,18			

N – broj ispitanica, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 31. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom



5.1.15. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom

Usporedili smo koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a te metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s obzirom na majčinu primjenu vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće (tablica 24 i 25, slika 32). Većina majki ispitanica nije uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju (110/127). Samo 5% majki ispitanica (6/127) je počelo s primjenom vitamina B₁₂ (u sklopu multivitaminskih preparata) prije začeća i primjenjivalo je tijekom prvog tromjesečja, dok je 19% (11/127) majka ispitanica uzimalo vitamin B₁₂, ali neadekvatno (započele su s primjenom vitamina B₁₂ između petog i osmog tjedna trudnoće). Novorođenčad majki koje nisu uzimale vitamin B₁₂ imala su viši AdoMet i AdoHcy u odnosu na novorođenčad majki koja su uzimala vitamin B₁₂, ali ne na razini statističke značajnosti. Usporedbom metilacijskog potencijala također nije nađena statistički značajna razlika između novorođenčadi majki koje su uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće i novorođenčadi majki koja nisu uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće.

Tablica 24. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom

	<i>Primjena</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	χ^2	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA	6	189,0	202,0	241,3	246,5	287,0	300,5	301,0	6,49	2	0,039
	NE	110	90,0	145,3	238,5	306,5	365,0	650,7	1050,0			
	Neadekvatna	11	107,0	124,0	161,2	196,0	297,0	452,5	559,0			
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	DA	6	44,00	46,50	56,25	63,00	79,50	88,00	89,00	1,91	2	0,384
	NE	110	16,00	27,45	48,25	68,00	97,00	170,85	225,00			
	Neadekvatna	11	22,00	24,00	34,00	49,00	79,74	155,00	222,00			
<i>MI</i>	DA	6	2,224	2,345	3,027	4,392	5,325	5,528	5,537	0,65	2	0,722
	NE	110	1,797	2,219	3,156	4,359	6,054	8,265	10,900			
	Neadekvatna	11	2,227	2,358	2,982	4,343	5,402	6,681	7,077			

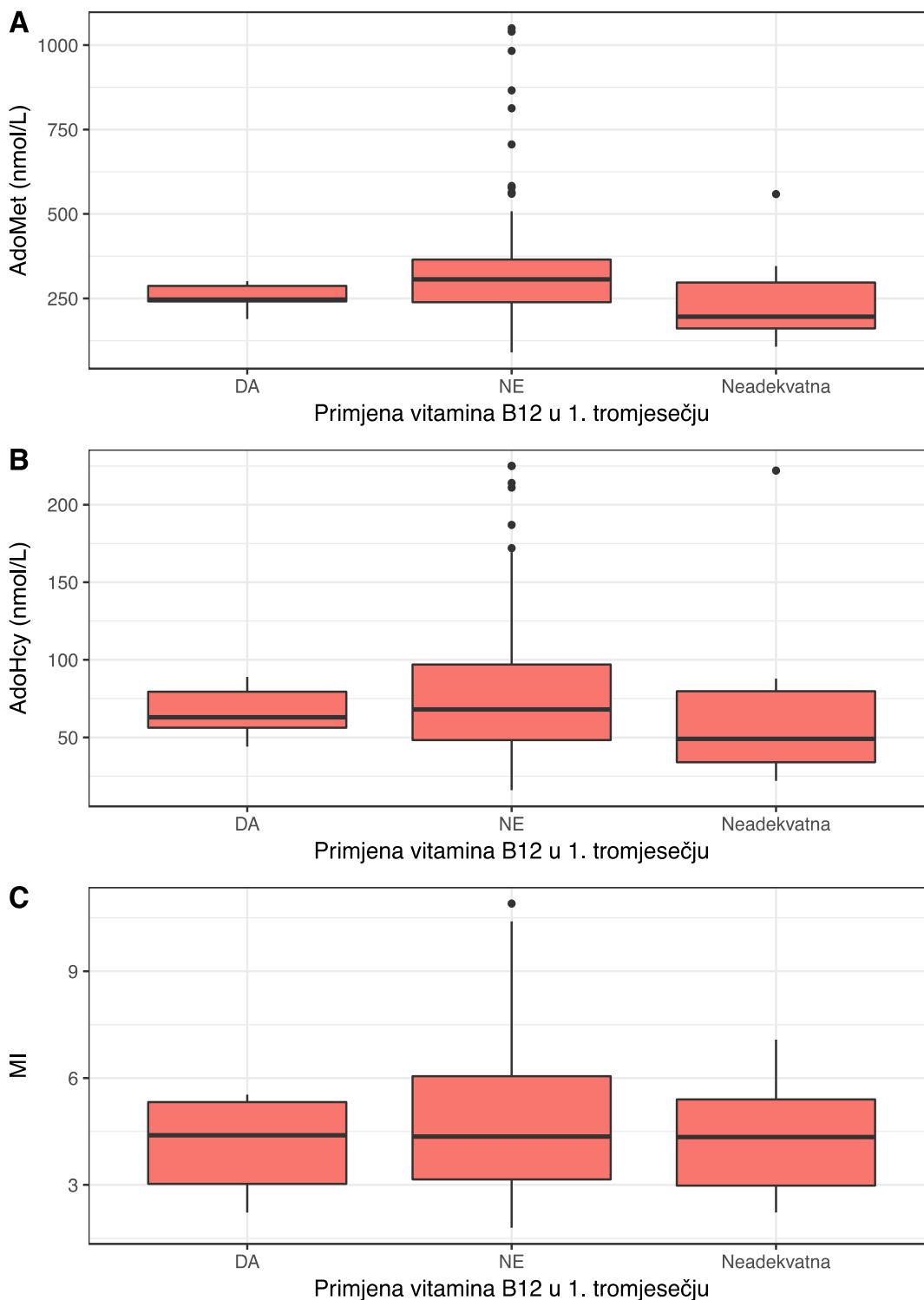
N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Tablica 25. Razlika u koncentraciji AdoMet-a između pojedinih skupina s obzirom na primjenu vitamina B₁₂ u u prvom tromjesečju trudnoće

	<i>Usporedba grupa</i>	<i>T</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA – NE	1,38	0,509
	DA – Neadekvatna	0,28	1,000
	NE – Neadekvatna	2,29	0,072

T – Conoverova test statistika, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 32. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u novorođenčadi s prirodnim srčanom greškom



5.1.16. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom

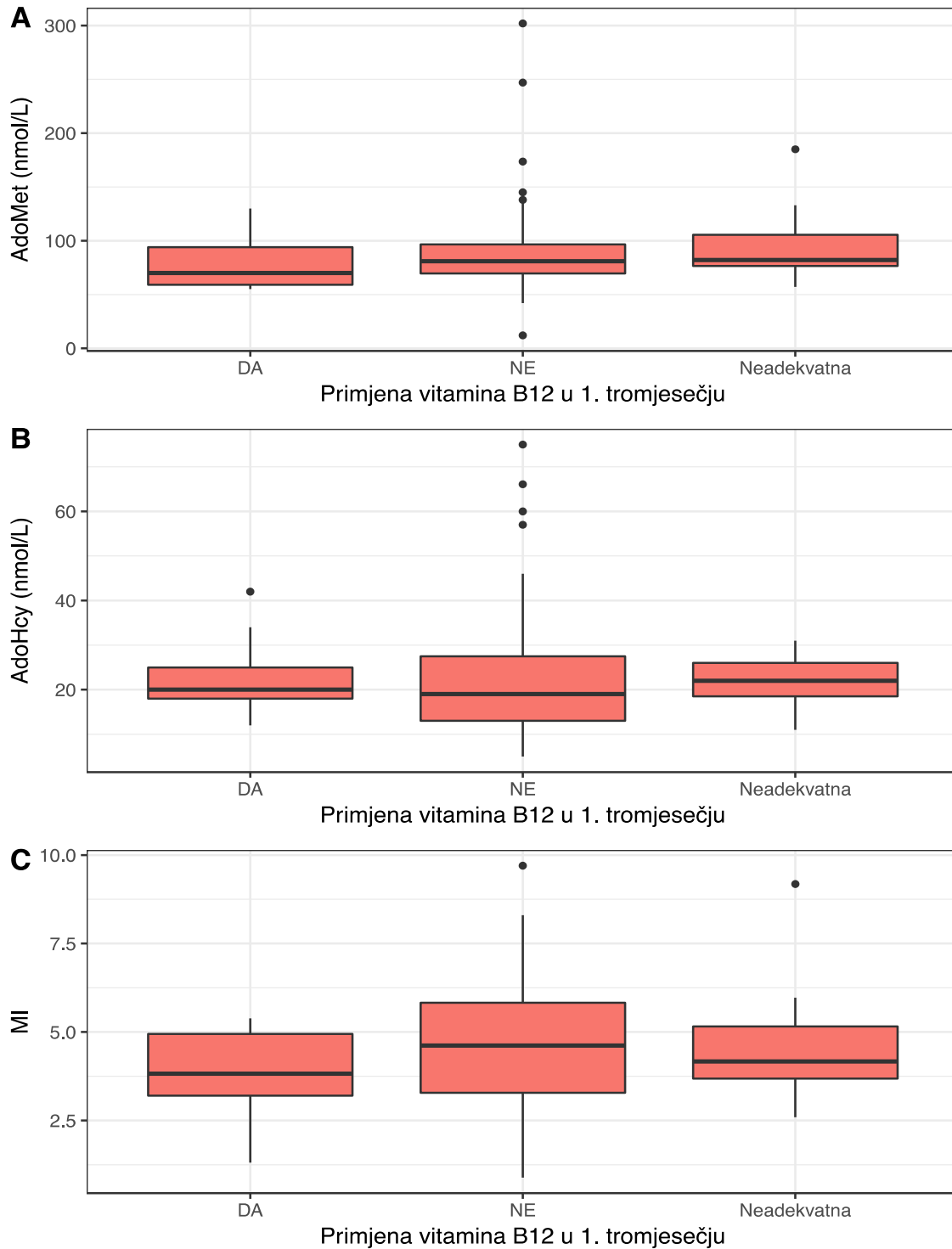
Analizirali smo koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal u ispitivanoj skupini majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s obzirom na majčinu primjenu vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće (tablica 26, slika 33). Usporedbom AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala ispitivanih skupina nije nađena statistički značajna razlika između majki koje su uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće i majki koja nisu uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće.

Tablica 26. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom

	<i>Primjena</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	<i>χ²</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet (nmol/L)</i>	DA	9	55,0	55,0	59,0	70,0	94,0	115,6	130,0	2,45	2	0,293
	NE	83	12,0	46,6	69,5	81,0	96,5	137,8	302,0			
	Neadekvatna	11	57,0	65,5	76,5	82,0	105,5	159,0	185,0			
<i>AdoHcy (nmol/L)</i>	DA	9	12,00	12,40	18,00	20,00	25,00	38,80	42,00	1,04	2	0,595
	NE	83	5,00	9,00	13,00	19,00	27,50	45,99	75,00			
	Neadekvatna	11	11,00	13,00	18,50	22,00	26,00	30,50	31,00			
<i>MI</i>	DA	9	1,310	1,730	3,200	3,824	4,947	5,320	5,385	1,08	2	0,583
	NE	83	0,885	1,865	3,281	4,619	5,826	7,989	9,700			
	Neadekvatna	11	2,591	2,815	3,683	4,167	5,158	7,575	9,182			

N – broj ispitanica, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 33. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentraciju AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal (MI) u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom



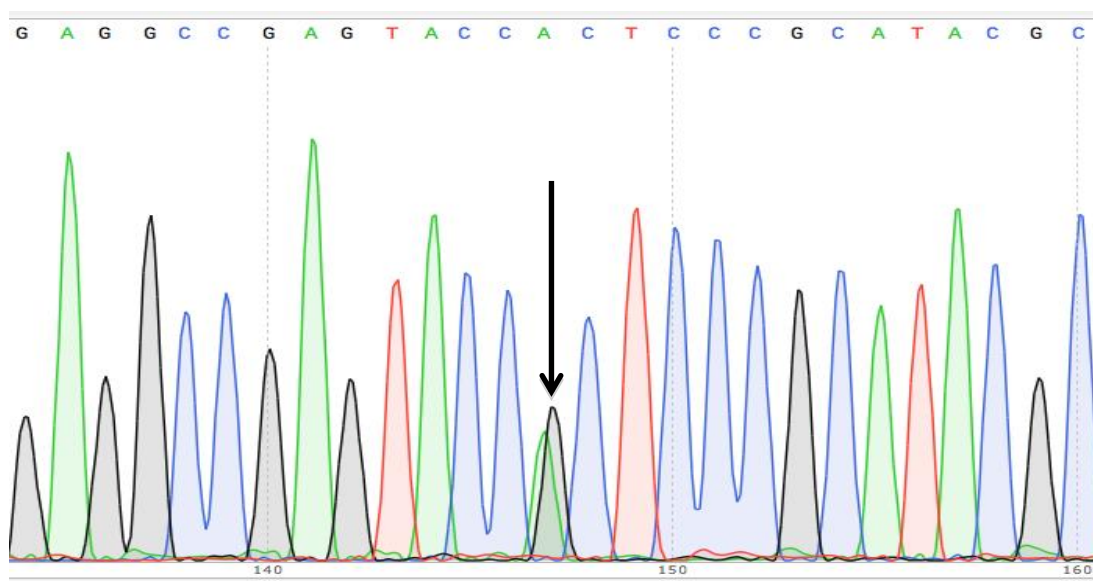
5.2. POLIMORFIZMI GENA *ACHY* U NOVOROĐENČADI S PRIROĐENOM SRČANOM GREŠKOM I NJIHOVIH MAJKI

5.2.1. Učestalost polimorfizama rs13043752 (112C>T) i rs41301825 (377G>A) gena *AHCY* u ispitivanim skupinama

Kvaliteta genomske DNA izdvojene iz pune krvi zadovoljila je kriterij kvalitete za daljnju analizu u 116 novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u 94 majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom.

U petero novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom (5/116) i u četiri majke novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom (4/94) otkriven je polimorfizam rs13043752 (112C>T) u heterozigotnom obliku, dok polimorfizam rs41301825 (377G>A) nije otkriven niti u jednog ispitanika i ispitanice. S obzirom na to da je incidencija polimorfizma rs13043752 u populaciji zdravih osoba u Republici Hrvatskoj 3,2%, a polimorfizma rs41301825 0,6% (158), egzaktnim binomnim testom nije dokazana statistički značajna razlika ($P < 0.05$) niti u ispitivanoj skupini novorođenčadi niti u ispitivanoj skupini majki u odnosu na opću populaciju. Uzevši u obzir pojedinačnu incidenciju, učestalost polimorfizma rs13043752 u populaciji novorođenčadi (5 od 116; $p = 4,4\%$; 95%CI =1,4–9,9 %) se statistički značajno ne razlikuje od pojavnosti u u populaciji zdravih osoba u Republici Hrvatskoj ($P = 0,419$). Učestalost polimorfizma rs13043752 u populaciji majki (4 od 94; $p = 4,3\%$; 95%CI=1,2-10,5%) se također statistički značajno ne razlikuje od pojavnosti SAHH-2 u populaciji Hrvata ($P = 0,548$). Kako polimorfizam rs41301825 nije otkriven niti u jednog novorođenčeta s prirođenom srčanom greškom niti u njihovih majki ($p = 0,0\%$; 95%CI =0,0–3,1%), učestalost u obje skupine se statistički značajno ne razlikuje od pojavnosti u u populaciji zdravih osoba u Republici Hrvatskoj ($p = 1,000$).

Slika 34. Kromatogram ispitanika koji je heterozigot za polimorfizam c.112 C>T (rs13043752) u egzonu 2, smjer 3' - 5'. Zamjena nukleotida je označena strelicom



5.2.2. Utjecaj polimorfizama rs13043752 (112 C>T) gena *AHCY* na koncentraciju S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski indeks u ispitivanim skupinama

Analizirali smo i međusobne odnose AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u ispitivanim skupinama s obzirom prisustvo polimorfizma rs13043752 (tablica 27 i 28, slika 35 i 36). Usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala korištenjem Wilcoxonovog testa sume rangova, nije dokazana statistički značajna razlika u koncentracijama navedenih metabolita i metilacijskom potencijalu među ispitanika koji imaju polimorfizam rs13043752 i ostalih ispitanika.

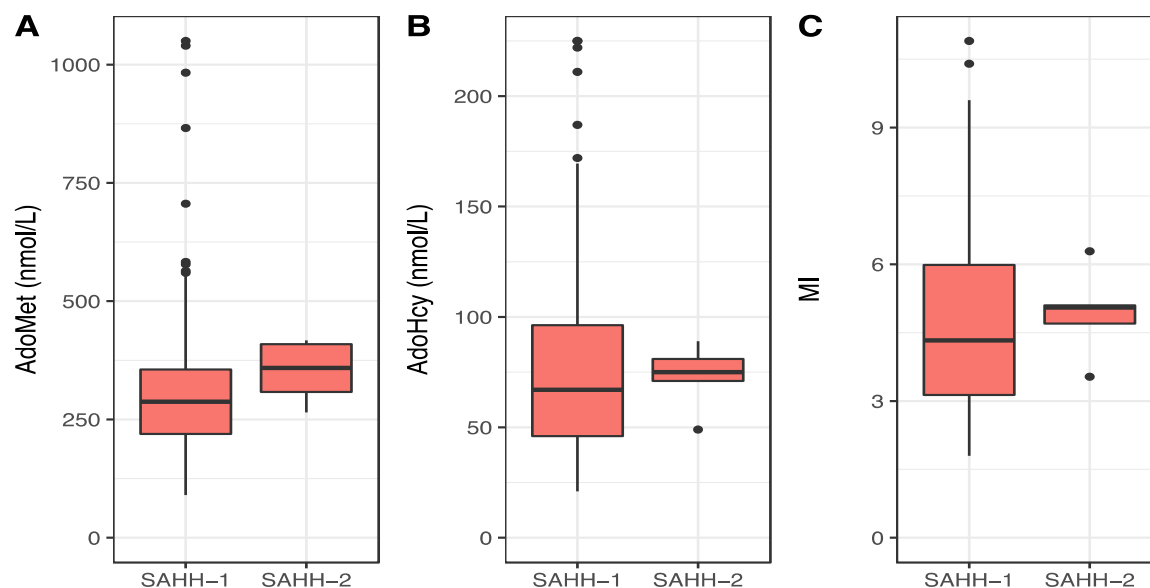
No, u skupini novorođenčadi (tablica 27, slika 35) nazire se trend višeg AdoMet-a u ispitanika koji imaju izoformu SAHH-2 u odnosu na ispitanike s izoformom SAHH-1 (medijan 359 nmol/L u ispitanika sa SAHH-2 izoformom u odnosu na 287,5 nmol/L u ispitanika sa SAHH-1 izoformom) te trend višeg metilacijskog potencijala (5,049 u ispitanika sa SAHH-2 izoformom u odnosu na 4,33 u ispitanika sa SAHH-1 izoformom).

Tablica 27. Usporedba koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala između novorođenčadi s prirodnom srčanom greškom s izoformama SAHH-1 i SAHH-2

	<i>Izoforma</i>	<i>N</i>	<i>Min</i>	<i>5. centila</i>	<i>25. centila</i>	<i>M</i>	<i>75. centila</i>	<i>95. centila</i>	<i>Max</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
<i>AdoMet</i> (<i>nmol/L</i>)	SAHH-1	111	90,0	145,3	219,3	287,5	355,5	580,8	1050,0	177,0	0,181
	SAHH-2	5	265,0	273,6	308,0	359,0	409,0	415,4	417,0		
<i>AdoHcy</i> (<i>nmol/L</i>)	SAHH-1	111	21,00	26,45	46,00	67,00	96,25	170,85	225,0	241,0	0,646
	SAHH-2	5	49,00	53,40	71,00	75,00	81,00	87,40	89,0		
<i>MI</i>	SAHH-1	111	1,797	2,211	3,132	4,330	5,985	7,965	10,9	229,0	0,533
	SAHH-2	5	3,533	3,767	4,700	5,049	5,100	6,049	6,28		

N – broj ispitanika, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 35. Usporedba koncentracija AdoMet-a (A), AdoHcy-a (B) i metilacijskog potencijala (MI) (C) između novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s izoformama SAHH-1 i SAHH-2



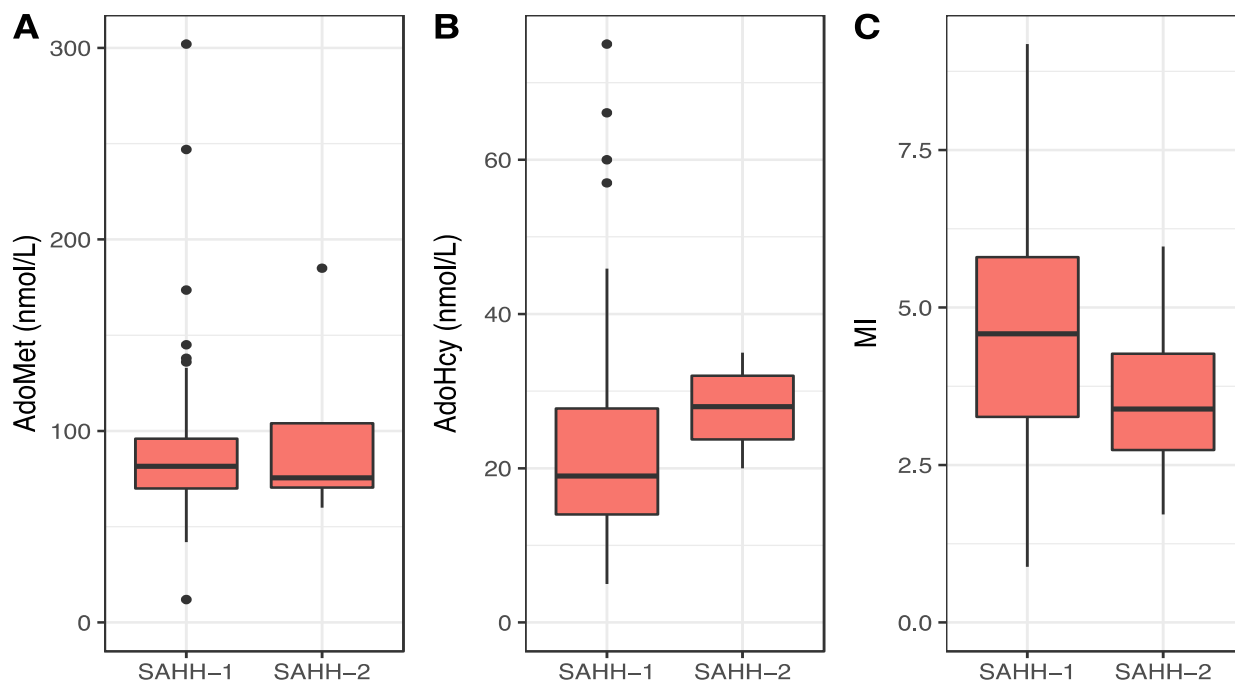
U skupini majki (tablica 28, slika 36) nazire se trend višeg AdoHcy-a u ispitanica koje imaju izoformu SAHH-2 u odnosu na ispitanice s izoformom SAHH-1 (medijan 28 nmol/L u ispitanica sa SAHH-2 izoformomom u odnosu na 19 nmol/L u ispitanica sa SAHH-1 izoformomom) te trend nižeg metilacijskog potencijala (3,39 u ispitanica sa SAHH-2 izoformomom u odnosu na 4,58 u ispitanica sa SAHH-1 izoformomom).

Tablica 28. Usporedba koncentracija AdoMet-a (nmol/L), AdoHcy-a (nmol/L) i metilacijskog potencijala između majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s izoformama SAHH-1 i SAHH-2

	Izoforma	N	Min	5. centila	25. centila	M	75. centila	95. centila	Max	W	p
AdoMet	SAHH-1	90	12,0	46,4	70,0	81,5	96,0	137,9	302,0	171,5	0,886
	SAHH-2	4	60,0	62,1	70,5	75,5	104,0	168,8	185,0		
AdoHcy	SAHH-1	90	5,00	9,00	14,00	19,00	27,75	45,74	75,00	92,5	0,145
	SAHH-2	4	20,00	20,75	23,75	28,00	32,00	34,40	35,00		
MI	SAHH-1	90	0,885	1,874	3,264	4,582	5,801	7,994	9,182	214,0	0,310
	SAHH-2	4	1,714	1,919	2,739	3,390	4,267	5,628	5,968		

N- broj ispitanica, Min – najmanja vrijednost, M – medijan, Max – najveća vrijednost, χ^2 – test statistika Kruskal-Wallisovog testa, df – broj stupnjeva slobode, p – razina značajnosti, MI – metilacijski potencijal

Slika 36. Usporedba koncentracija AdoMet-a (A), AdoHcy-a (B) i metilacijskog potencijala (MI) (C) između majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s izoformama SAHH-1 i SAHH-2

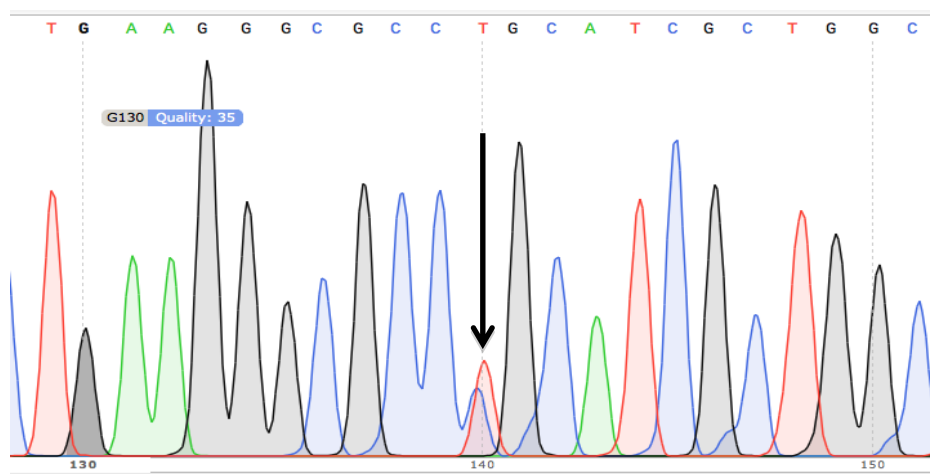


5.2.3. Dodatne mutacije otkrivene ispitivanjem polimorfizma gena *AHCY*

U jednog ispitanika nađena je mutacija kodona 49 u egzonu 2 u heterozigotnom obliku u kojoj je na 145. položaju citozin zamijenjen timinom (c.145C>T) (slika 37). U navedenog ispitanika koji je bolovao od VSD-a AdoMet je u trećem danu života iznosio 328 nmol/L (medijan za prvi tjedan života u ispitanika iznosi 328 nmol/L), AdoHcy 95 nmol/l (medijan za prvi tjedan života u ispitanika iznosi 81 nmol/L), dok je MI iznosio 3,45 (za prvi tjedan života u ispitanika iznosi 4,18). Iz navedenog je vidljivo da nema značajnih odstupanja mjerenih metabolita i njihovog omjera u ispitanika s navedenom mutacijom u odnosu na ispitivanu skupinu.

Vugrek i suradnici su 2009. godine (43) učinili funkcionalnu analizu proteina nastalog mutacijom p.49A>C te dokazali da ona u homozigotnom obliku značajno reducira aktivnost enzima SAHH. Navedeni mutirani protein formira disulfidne veze te potiče stvaranje makromolekulskih struktura čija je katalitička aktivnost iznosi samo 6,9% katalitičke aktivnosti divljeg tipa proteina. Moguće je da je u našeg ispitanika koji je heterozigot za navedenu mutaciju aktivnost enzima SAHH djelomično reducirana što je rezultiralo povišenim vrijednostima i AdoMet-a i AdoHcy-a u odnosu na referentnu skupinu te smanjenim metilacijskim potencijalom, no razlike u odnosu na ostale ispitanike ne postoje.

Slika 37. Kromatogram ispitanika koji je heterozigot za mutaciju c.145C>T (rs13043752) u egzonu 2, smjer 3' - 5'. Zamjena nukleotida je označena strelicom



6. RASPRAVA

Na početku istraživanja pretpostavljeno je da poremećaj metilacije doprinosi patogenezi srčanih grešaka. U prilog tome govore istraživanja Kapuste, Verkleij-Hagoorta i Hobbs (24,25,101) koja su dokazala povezanost povišene koncentracije homocisteina u plazmi majki i pojavnosti prirodene srčane greške. No, upitno je je li povišena koncentracija homocisteina u plazmi majki čimbenik rizika za pojavu prirodene srčane greške ili je veća pojavnost prirodene srčane greške posljedica nakupljanja prethodnika homocisteina u metabolizmu metionina. Stoga smo određivali koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i njihovih majki i uspoređivali ih s koncentracijama navedenih metabolita u referentnim skupinama.

Istraživanje je trebalo biti provedeno na 100 parova novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i njihovih majki, no realno je broj ispitanika bio veći (127 novorođenčadi, 103 majke) budući da neke majke u trenutku uzimanja uzorka više nisu zadovoljavale ulazne kriterije ili nisu bile u mogućnosti dati uzorak krvi. Uzorak krvi uzimali smo novorođenčadi tijekom prvih 28 dana života, ali ipak što bliže trenutku poroda (nakon dobivanja pristanaka od strane roditelja) kako bi dobiveni rezultati što više oslikavali perikonceptijske uvjete. U želji da dobiveni rezultati budu što bolja preslika stanja u perikonceptijskom razdoblju, majkama se uzimao uzorak krvi između šestog tjedna i kraja prve godine djetetovog života (najveći dio uzoraka je uzet između šestog i dvanaestog tjedna života djeteta). Naime, dokazano je da se koncentracija folata i vitamina B₁₂ smanjuje tijekom trudnoće, no šest tjedana nakon poroda biva ista kao u perikonceptijskom razdoblju ukoliko majka nije značajno mijenjala svoje životne navike (pušenje, prehrana, alkohol) (168). Koncentracija homocisteina se tijekom druga dva tromjesjeća trudnoće postupno smanjuje, da bi nakon poroda bila minimalno povećana u odnosu na perikonceptijske koncentracije. Iako postoje spoznaje da životna dob također utječe na koncentracije homocisteina, folne kiseline i vitamina B₁₂, one se ne bi se trebale mijenjati u periodu od jedne do dvije godine (169). Na taj način bi koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u razdoblju od šest tjedana do godine dana nakon poroda trebale oslikavati stanje u perikonceptijskom razdoblju kada se embriogeneza i događa. Anterogradno ispitivanje na majkama u Hrvatskoj je gotovo nemoguće s obzirom na godišnji broj poroda i pojavnost

prirođene srčane greške: naime, bilo bi potrebno uzeti uzorak krvi svakoj trudnici tijekom 18 mjeseci kako bi se skupila skupina od stotinjak majki novorođenčadi koja boluju od prirođene srčane greške i zadovoljavaju ulazne kriterije.

Naši rezultati potkrepljuju pretpostavku da su poremećaji metilacije jedan od čimbenika koji mogu doprinjeti većoj pojavnosti prirođenih srčanih grešaka. Naime, i u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u njihovih majki postoje statistički značajna odstupanja koncentracija AdoMet-a i/ili AdoHcy-a u plazmi te metilacijskog potencijala u odnosu na referentnu skupinu.

6.1. POREMEĆAJ METILACIJE U MAJKI NOVOROĐENČADI S PRIROĐENIM SRČANIM GREŠKAMA

6.1.1. Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama u odnosu na referentnu skupinu

U majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama našli smo statistički značajno povišenu koncentraciju AdoHcy-a u odnosu na referentnu skupinu ($P < 0,001$). Također smo utvrdili statistički značajno niži metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu ($P < 0,001$). Čak 30% ispitanica (34/103) imalo je koncentraciju AdoHcy-a iznad gornje granice referentnih vrijednosti, dok je 39% ispitanica (40/103) imalo metilacijski potencijal niži od donje granice referentnih vrijednosti. Dodatno, oko 10% ispitanica imalo je i značajno više koncentracije AdoMet-a (uz povišene koncentracije AdoHcy-a) u odnosu na zdrave žene reproduktivne dobi iz referentne skupine, kao i u odnosu na većinu ispitanica uključenih u istraživanje.

Koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u majki djece s prirođenom srčanom greškom do sad su analizirali Hobbs i suradnici (101), Obermann-Borst i suradnici (104) te Alsayed i suradnici (105), ali u značajno drugačijim uvjetima od naših. Kao što je već navedeno, u našem je istraživanju vrijeme od trenutka razvoja srca (prvo tromjesečje trudnoće) do trenutka uzimanja

uzoraka svedeno na minimum s obzirom da su se uzorci novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom uzimali u prva četiri tjedna života (medijan šest i pol dana), a uzorci majki navedene novorođenčadi uglavnom između šestog i dvanaestog tjedna života. U navedenim istraživanjima od trenutka embriogeneze do trenutka uzimanja uzoraka majkama djece s prirođenom srčanom greškom proteklo je dvije do osam godina te nije moguće sa sigurnošću tvrditi da ispitanice nisu promijenile neke od važnih navika (npr. pušenje, alkohol, prehrana) koje mogu utjecati na koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi.

Rezultati istraživanja Obermann-Borsta i Alsayeda u značajnom su nesuglasju s našim. Naime, u istraživanju Obermann-Borsta provedenog u majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama prosječno sedamnaest mjeseci nakon poroda (N=179) nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama AdoMet-a i AdoHcy-a te u metilacijskom potencijalu u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u studiji Alayeda i suradnika koje je uključivalo majke s prirođenim srčanim greškama (N=80) i njihovu djecu (N=50) prosječne dobi šesnaest mjeseci koncentracija AdoHcy-a u majki bila čak niža (iako ne statistički značajno), a metilacijski potencijal viši u odnosu na kontrolnu skupinu.

S druge strane, rezultati istraživanja Charlotte Hobbs i suradnika (101) pokrepljuju naše rezultate. Hobbs i suradnici proveli su veliko istraživanje koje je obuhvaćalo majke djece s prirođenim srčanim greškama, s tim da vrijeme od završetka trudnoće (bilo porodom, bilo spontanom ili namjernim pobačajem) do uzimanja uzorka krvi majke nije bilo definirano (od poroda do punih šest godina života djeteta). Skupina ispitanica nije se razlikovala od naše; u istraživanje je bilo uključeno 224 majki novorođenčadi koje su imali malformacije srčanog septuma, konotrunkalne malformacije te sindrom hipoplastičnog lijevog ili desnog srca, a isključene su majke djece koja su uz srčanu grešku imale i kromosomsku anomaliju, poznatu monogensku nasljednu bolest ili poznati sindrom. Istraživanje je pokazalo da je koncentracija tHcy u plazmi ispitanica bila u 31,7% slučajeva iznad 95. centile koncentracije tHcy u kontrola. 13,5% ispitanica imalo je koncentraciju AdoHcy-a iznad 95. centile koncentracije AdoHcy-a u kontrola. U našem istraživanju koncentracije AdoHcy-a više od gornje granice referentnog raspona u ispitivanoj skupini je imalo 33% (34/103), a u referentnoj skupini samo 4% (2/47) ispitanica. Metilacijski potencijal u istraživanju Charlotte Hobbs i suradnika bio je 1,4 puta niži u

odnosu na kontrolnu skupinu (2,67 naprama 3,72), dok je u našem istraživanju bio 1,22 puta niži u odnosu na referentnu skupinu (4,54 naprama 5,54).

Mogući razlog povećanja koncentracije AdoHcy-a u plazmi majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama uključuje manjak vitamina B₁₂ i folne kiseline. Iako se odavno zna da majke koje perikonceptijski uzimaju dodatno folnu kiselinu i vitamin B₁₂ imaju značajno manji rizik od pojave rascjepa neuralne cijevi, rascjepa usne i nepca i prirodene srčane greške u potomaka, u današnje vrijeme kad se vrši prevencija pojave kongenitalnih malformacija uzimanjem folne kiseline ovaj bi razlog trebao biti sve manje prisutan. Nažalost, naše istraživanje pokazalo je da je dodatna perikonceptijska primjena folne kiseline i vitamina B₁₂ u naših ispitanica bila uglavnom neadekvatna ili je nije bilo. U ostalim, prije navedenim istraživanjima (94,104,105) izmjerene su koncentracije navedenih metabolita i nije bilo statistički značajne razlike između koncentracije vitamina B₁₂ i folne kiseline u ispitanica i kontrola. Iako mi nismo mjerili navedene metabolite i ne možemo znati kakve su njihove koncentracije u plazmi naših ispitanica, nismo našli statistički značajnu razliku u koncentracijama AdoMet-a i AdoHcy-a te u metilacijskom potencijalu između ispitanica koje su uzimale i onih koje nisu perikonceptijski uzimale nadoknadu folne kiseline i vitamina B₁₂, tako da to vjerojatno nije primarni razlog metilacijskog poremećaja u našoj skupini ispitanica. No, s obzirom na mali broj ispitanica koje su perikonceptijski adekvatno uzimale folnu kiselinu i vitamin B₁₂, ne možemo tvrditi sa sigurnošću da ne rezultati ne bi bili drugačiji na većem broju ispitanica.

6.1.2. Kako smanjeni metilacijski potencijal i povišena koncentracija S-adenozilhomocisteina u majke djeluje pojavu prirodene srčane greške u potomaka?

U skupini ispitivanih majki novorođenčadi s prirodnom srčanom greškom dokazali smo statistički značajnu višu koncentraciju AdoHcy-a i statistički značajan niži metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu što upućuje da bi povišena koncentracija AdoHcy-a i sniženi metilacijski potencijal u trudnica mogli biti čimbenik koji povećava rizik za nastanak prirodene srčane greške.

Niži metilacijski potencijal u našoj ispitivanoj skupini majki upućuje na promjenu procesa metilacije u stanici. U uvodu je detaljno opisan mehanizam putem kojeg bi reducirani metilacijski potencijal mogao utjecati na stanične mehanizme (65-80). No, vrlo je vjerojatno da i koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a, a ne samo njihov međusoban odnos, utječu na održavanje ravnoteže procesa metilacije unutar stanice.

Iako je većina ispitanica imala uredne koncentracije AdoMet-a, visoke koncentracije AdoHcy-a i posljedično snižen metilacijski potencijal, izdvaja se šest ispitanica koje su imale uz povišen AdoHcy i više koncentracije AdoMet-a te posljedično uredan metilacijski potencijal. Iako su ispitanice imale uredan metilacijski potencijal, moguće je da koncentracija AdoHcy-a u stanici bila dovoljno visoka utječe na određene biološke procese unutar stanice ili da inhibira neku od metiltransferaza koje ovise o AdoHcy-u.

Iako nije poznato štetno djelovanje visokih koncentracija AdoHcy-a na razvoj srca, zna se da iste štetno djeluju na mozak i jetru. Naime u nizu istraživanja na hepatičnim staničnim linijama i staničnim linijama mikroglije uočeno je da visoke koncentracije AdoHcy-a povećavaju staničnu citotoksičnost i uzrokuju oštećenje DNA putem hipometilacije DNA (172,173). Također je u intestinalnim humanim stanicama i mišjim endotelnim stanicama dokazano o dozi AdoHcy-a ovisno oštećenje DNA i inhibicija DNA popravka, ponajprije zbog neodgovarajućeg ugrađivanja uracila (174).

U prilog nepovoljnom djelovanju AdoHcy-a usprkos urednom metilacijskom potencijalu govori istraživanje Capdevile i suradnika koji su dokazali da je egzokrina funkcija stanica gušerače u miša značajno narušena s povišenjem koncentracije AdoHcy-a, a uz normalan metilacijski potencijal (175).

Neke su metiltransferaze posebno osjetljive na AdoHcy te su snažnije inhibirane s porastom koncentracije AdoHcy, bez postojanja promjene u metilacijskom potencijalu (176). Među njih pripadaju DNA (citozin-5)-metiltransferaza (E.C.2.1.137), katehol *O*-metiltransferaza (E.C.2.1.1.6), fosfatidiletanolamin *N*-metiltransferaza (E.C.2.1.1.17), histonlizin *N*-metiltransferaza (E.C.2.1.1.43), tRNA i mRNA metiltransferaze, acetilserotonin *O*-metiltransferaze (E.C.2.1.1.4) te histamin *N*-metiltransferaza (E.C.2.1.1.8). Posljedice inhibicije ovih

metiltransferaza su sveobuhvatne i uključuju demijelinizaciju središnjeg živčanog sustava, smanjenu sintezu neurotransmitora, smanjenu kemotaksiju i fagocitozu makrofaga, promijenjen fosfolipidni sastav membrane stanica, promjenjenu gensku ekspresiju i staničnu diferencijaciju te je moguće da pridonose nastanku prirođenih srčanih grešaka (176).

Povišeni unutarstanični AdoHcy u normalnim uvjetima dovodi do pojačane aktivnosti CBS-a kako bi se spriječilo pojačano nakupljanje AdoHcy-a i Hcy-a. CBS je eksprimiran u jetri, gušterači, bubregu i mozgu, dok su ostala tkiva u kojima nema tog enzima (uključujući i srce), podložnija toksičnim učincima nakupljenog Hcy-a i AdoHcy-a (177), inhibiciji DNA metiltransferaza i pridruženim poremećajima u ekspresiji gena. U prilog činjenici da ponajprije nakupljanje AdoHcy-a, a ne metilacijski potencijal djeluje toksično ide i istraživanje Caudilla i suradnika (177) koji su procjenjivali tkivno specifičnu DNA-metilaciju u miša heterozigotnog za CBS. Istraživanje je pokazalo značajnu korelaciju između koncentracije AdoHcy-a i hipometilacije DNA u jetri, bubregu, mozgu i testisima CBS heterozigotnog miša u odnosu na kontrolu, dok je korelacija između metilacijskog potencijala i hipometilacije DNA bila puno slabije izražena.

Moguće je da je toksično djelovanje visokih koncentracija AdoHcy-a sinergistički pojačano toksičnim djelovanjem visokih koncentracija homocisteina. Naveli smo već prije niz istraživanja u kojima koja su dokazali povezanost povišene koncentracije homocisteina u plazmi majki i pojavnosti prirođene srčane greške (24,25,101). Visoke koncentracije homocisteina mogu biti ne samo posljedica poremećaja metilacije, već i pojačanog oksidativnog stresa zbog smanjenog antioksidacijskog mehanizma ovisnog o glutationu (102). Naime, u majki djece sa srčanim greškama u istraživanju Hobbs i suradnika iz 2005. godine (102) nađene su snižene koncentracije vitamina B₆, reduciranog glutationa (GSH) i cisteina te povišene koncentracije oksidiranog glutationa (GSSG) što govori u prilog učinka kroničnog oksidativnog stresa u majke na pojavu prirođene srčane greške u novorođenčeta.

6.2. POREMEĆAJ METILACIJE U NOVOROĐENČADI S PRIROĐENIM SRČANIM GREŠKAMA

6.2.1. Koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina te metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama u odnosu na referentnu skupinu

U novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom nismo, za razliku od njihovih majki, našli povećane koncentracije AdoHcy-a u plazmi i posljedično sniženi metilacijski potencijal. Dapače, u novorođenčadi smo u odnosu na referentnu skupinu ustanovili statistički značajno višu koncentraciju AdoMet-a; medijan za AdoMet je bio 1,57 puta veći u ispitanika u odnosu na referentnu skupinu. S druge strane koncentracije AdoHcy-a u plazmi ispitanika nisu se značajno razlikovale u odnosu na referentnu skupinu. Posljedično je i metilacijski potencijal u skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom bio statistički značajno veći u odnosu na referentnu skupinu.

Opravdano je zapitati se je li statistički značajno viši medijan AdoMet-a u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na referentnu skupinu u određenoj mjeri i posljedica različitog načina prehrane među skupinama. Naime, velik je broj novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u trenutku uzimanja uzorka bio na djelomičnoj ili potpunoj parenteralnoj prehrani. Pitanje je je li takav način prehrane pridonio povećanom unosu metionina u odnosu na referentnu skupinu, a povećani unos metionina doveo do porasta koncentracije AdoMet-a. No, u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom se u prosjeku unosilo oko 2 do 2,5 g/kg/d proteina putem 10%-tne otopine aminokiselina Aminoven Infant (3,12 g metionina na 1000 ml) te je prosječni unos metionina u ovoj skupini iznosio oko 60 do 80 mg/kg/d. Median dobi referentne skupine u trenutku uzimanja uzorka bio je puna tri dana života. Za predmnijevati je da je enteralni unos u tom trenu bio oko 300 do 400 ml dnevno, bilo majčina mlijeka (213 do 287 mg metionina na 1000 ml) (178), bilo adaptiranog mliječnog pripravka za novorođenčce (npr. Aptamil 261 mg metionina na 1000 ml) te iznosio oko 95 mg/kg/d (74-115 mg/kg/d) metionina. Također je poznato da je iskoristivost enteralno unešenog metionina oko 69% (179) te se može zaključiti da je dnevni unos metionina u ispitivanoj skupini bio minimalno viši u odnosu na dnevni unos u referentne skupine. Inače, prosječan unos metionina u novorođenčeta hranjenog

adaptiranim mliječnim pripravkom iznosi 73 do 119 mg/kg/d (180), dok je već svakodnevni enteralni unos metionina veći od 125 mg/kg/d u određene novorođenčadi i dojenčadi doveo do hipermetioninemije praćene homocisteinemijom i neurološkim simptomima tipičnim za hipermetioninemiju bez obzira na njezin uzrok (180). Parenteralni unos metionina od 115 mg/kg/d u istom istraživanju nije doveo do povećanja koncentracije metionina u plazmi iznad gornje granice referentnih vrijednosti (referentne vrijednosti našeg laboratorija u novorođenačkoj dobi iznose 15 do 35 $\mu\text{mol/L}$). Unos metionina u skupini novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u našem istraživanju prema našim spoznajama nije prelazio 80 mg/kg/d.

Osim toga, u prva tri dana života novorođenče je zbog mogućnosti malog enteralnog unosa koji rezultira gubitkom do 10% rodne mase u stanju katabolizma. Dokazano je da stanje katabolizma samo po sebi uzrokuje blago povećanje koncentracije AdoMet-a. Bolesnici s teškim opeklinama imali su viši AdoMet tijekom potpune parenteralne prehrane, ali je on ostao povišen i nakon uvođenja potpune enteralne prehrane (181). U tih pacijenata nađena je povećana transmetilacija i transulfuracija metionina. Gladovanje kao proces koji također dovodi do katabolizma proteina također uzrokuje povećanje koncentracije AdoMet-a u plazmi. Kalhan i suradnici su 2011. godine pokazali da je u štakora izloženog gladovanju brzina pojavljivanja metionina u plazmi mjerena tragačem $^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$ bila statistički značajno viša u odnosu na štakora koji ne gladuje sugerirajući povećanu transmetilaciju metionina (182). U istih životinja izmjerene su i povećane koncentracije AdoMet-a (iako ne statistički značajno), niže koncentracije AdoHcy-a te statistički značajno viši metilacijski potencijal u odnosu na životinje koje nisu bile izložene niskoproteinskoj dijeti. Semmler i suradnici pokazali da i katabolička stanja poput sepse u miša također dovode do statistički značajno višeg AdoMet-a u plazmi te statistički značajnog povećanja metilacijskog potencijala (183).

Stoga je moguće tvrditi da se usprkos približno 1,1 puta višem unosu metionina u skupine novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama u odnosu na referentnu skupinu koncentracije AdoMet-a mogu uspoređivati te da je 1,57 puta veći medijan AdoMet-a u odnosu na referentnu skupinu realan nalaz. U prilog toj činjenici ide i spoznaja da u ispitivanoj skupini nisu nađene značajno povećane koncentracije metionina u odnosu na zdravu novorođenčad (koncentracije metionina određivane su u sklopu obvezatnog novorođenačkog probira na metaboličke bolesti u 50 od 127 ispitanika). Također, u ispitane skupine koncentracije AdoHcy-a su bile niže u odnosu

na referentnu skupinu (iako ne statistički značajno), dok je za očekivati da bi bile povišene ukoliko bi razlog za povećanje koncentracije AdoMet-a bila hipermetionemija uzrokovana povećanim parenteralnim unosom metionina.

Kao potvrda činjenice da je AdoMet u plazmi doista povišen u ovih ispitanika govore i koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a učinjene naknadno u ispitanika s inicijalno izrazito visokim koncentracijama navedenih metabolita. Naime, u petero novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom izmjeren je AdoMet više nego dvostruko viši (od 706 do 1050 nmol/L) od maksimalnog izmjerenog u novorođenčadi u referentnoj skupini s tim da je koncentracija AdoHcy-a u plazmi tih ispitanika bila 1,1 do 1,7 puta viša (140 do 225 nmol/L) nego maksimalne koncentracije izmjerene u novorođenčadi u referentnoj skupini. U tri ispitanika u kojih smo u dobi od 1 do 2 godine u sklopu dodatne obrade ponovili mjerenje koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi istom metodom nađene su ponovno povišene koncentracije navedenih metabolita. Tako u ispitanice s najvišim izmjerenim AdoMet-om u novorođenačkoj dobi (AdoMet 1050 nmol/L, AdoHcy 225 nmol/l, MI 4,7) koja je imala hipoplaziju luka aorte s koarktacijom, u dobi od dvije godine i dalje perzistiraju visoke koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a (AdoMet 320 nmol/L, AdoHcy 95 nmol/L, MI 3,4), statistički značajno veće u odnosu na referentne vrijednosti za dob.

Statistički značajno povišenje koncentracije AdoMet-a u djece sa složenim prirođenim srčanim greškama uočili su u svojim istraživanjima i Obermann-Borst i suradnici (104) te Alsayed i suradnici (105). Istraživanje Obermann-Borsta i suradnika (104) obuhvaćalo je malu skupinu djece sa prirođenim srčanim greškama koju su podijelili na skupinu nesindromskih bolesnika (osam ispitanika) i skupinu djece s pridruženim sindromima (osam ispitanika s Downovim sindromom i osam ispitanika s ostalim sindromima). Medijan AdoMet-a je u nesindromskih bolesnika sa složenim srčanim greškama bio 1,1 puta veći u odnosu na kontrolnu skupinu, dok AdoHcy i metilacijski potencijal nisu pokazivali značajna odstupanja od kontrolne skupine. Koncentracije folne kiseline u serumu i eritrocitima djece s prirođenim srčanim greškama također su bile statistički značajno više u odnosu na kontrole. Skupina ispitanika s Downovim sindromom imala je najviše koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i folne kiseline u eritrocitima te najniži metilacijski potencijal, što sugerira sveukupnu hipometilaciju u osoba koje boluju od Downova sindroma.

Verkleij-Hagoort i suradnici su također u djece s prirođenom srčanom greškom utvrdili više koncentracije folne kiseline i vitamina B₁₂ u serumu te niže koncentracije homocisteina u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu (25). Majke te djece s hiperhomocisteinemijom imale su statistički značajno niže koncentracije folne kiseline i vitamina B₁₂ u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu.

Za pretpostaviti je da perikonceptijska izloženost fetusa majčinom sveukupnom hipometilacijskom stanju može uzrokovati promjene u epigenetskom programiranju gena koje posljedično vode do pojave prirođene srčane greške i promjene u programiranju metilacijskih procesa u fetusa. U prilog toj tvrdnji ide istraživanje Chowdhurya i suradnika koji su u majki djece sa složenim prirođenim srčanim greškama našli brojne gen-specifične razlike u metilaciji u odnosu na kontrolnu skupinu (184). U ispitanica su mnogi geni za koje se otprije zna da su povezani s većom pojavnošću prirođenih srčanih grešaka, a koji su uključeni u mitogenom aktivirane protein kinazne (MAPK) procese (kao što su transkripcija, proliferacija, migracija, diferencijacija i preživljavanje) (185, 186) bili različito metilirani. Također se uvidjelo da postoji različita metilacija gena EGFR, GATA4 i Wnt5a za koje se otprije zna da sudjeluju u razvoju srca te gena GPX3 čija poremećena metilacija može povećati oksidativni stres u fetusa. Nađene su i promjene u metilaciji brojnih mitohondrijskih RNA čije se mutacije u zadnje vrijeme povezuju s prisustvom prirođenih srčanih grešaka (187).

Također je moguće i da majčina globalna hipometilacija dovodi do promjene u metaboličkom imprintingu gena uključenih u ciklus folata (poput gena *MTHFR*) ili gena koji kodiraju enzime ovisne o vitaminu B₁₂ (poput gena *MTRR* i *TCII*) te posljedičnog povećanja koncentracija folne kiseline i vitamina B₁₂ u novorođenčadi i promjene koncentracija AdoMet-a u prije provedenim istraživanjima (25,104,105). O utjecaju majčinog metilacijskog statusa na metilaciju gena u potomaka govori i istraživanje Haggarty-a i suradnika (188). Oni su pokušali ustanoviti utjecaj perikonceptijske primjene folne kiseline na metilaciju gena *IGF2*, *rPEG3*, *SNRP* i *LINE1* u pupkovini ovisno o statusu *MTHFR*-a. Iako nisu našli povezanost između koncentracije folne kiseline u eritrocitima, metilacije navedenih gena i statusa *MTHFR*-a s obzirom na primjenu folne kiseline perikonceptijski, zamijetili su da je u novorođenčadi majki koja su uzimala folnu kiselinu iza dvanaestog tjedna gestacije te tako mijenjala svoj metilacijski

status prisutna značajna hipermetilacija gena *IGF2* i hipometilacija gena *PEG3* i *LINE1*. U prilog tvrdnji da majčina globalna hipometilacija dovodi do promjene u metaboličkom imprintingu gena govori i istraživanje Tserge i suradnika koji su ustanovili da su niske koncentracije vitamina B₁₂ u pupkovini povezane s poremećenom alel-specifičnom ekspresijom gena *IGF2* u novorođenčadi s genotipom *MTHFR 677T>T* (189).

U istraživanju Alsayede i suradnika (105) koje je obuhvaćalo metabolite u sustavu remetilacije putem betainhomocistein metiltransferaze (BHMT) djeca sa prirođenom srčanom greškom također su imala 1,3 puta više koncentracije AdoMet-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Uz to su imala i povišene koncentracije vitamina B₁₂ i dimetilglicina u odnosu na kontrolnu skupinu te niže koncentracije betaina, dok statistički značajne razlike u koncentraciji AdoHcy-a i u metilacijskom indeksu nije bilo. Majke djece su pak imale statistički značajno niže koncentracije vitamina B₁₂.

Moguće je i da snižene koncentracije vitamina B₁₂ u majke dovode u djece do pojačane aktivnosti enzima metionin adenziltransferaze II (MAT II) ili inhibicije enzima odgovornih za dekarboksilaciju AdoMet-a koji su uključeni u sintezu poliamina u mitohondrijima te tako povećavaju koncentraciju AdoMet-a. No, povećanje DMG uz AdoMet upućuje i na mogućnost pojačane aktivnosti BHMT-a ili poremećaja mitohondrijskog metabolizma DMG-a, tj. enzima dimetilglicin dehidrogenaze i sarkozin dehidrogenaze (enzimi respiratornog lanca, mitohondrijski proteini koji vežu folate). Naime, mitohondrijski poremećaji su opisani u više navrata u bolesnika s prirođenom srčanom greškom (190,191).

Potrebna su daljnja istraživanja koja prelaze okvire ove doktorske disertacije kako bi se otkrio točan mehanizam putem kojeg dolazi do povećanja AdoMet-a u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama.

6.2.2. Potencijalna štetnost povišenih koncentracija S-adenozilmetionina u novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama

Poznato je da poremećaji metabolizma AdoMet-a imaju teške posljedice za život te za diferencijaciju i funkciju stanica, prvenstveno jetre i središnjeg živčanog sustava (35-47). Niske koncentracije AdoMet-a u plazmi povezane su sa stanjima poput depresije, Parkinsonove bolesti, demencije, osteoartritisa, fibromialgije, ciroze jetre uslijed alkoholizma i intrahepatične kolestaze, oštećenja jetre nakon terapije citostaticima, zloćudnim bolestima (48-52)... No, u zadnjih nekoliko godina došlo se do spoznaje da povišene koncentracije AdoMet-a također mogu imati štetno djelovanje.

Potencijalna štetnost AdoMet-a pokazana je i u istraživanju Zannate i suradnika koji su opisali da povećana koncentracija AdoMet-a u eksperimentalnim uvjetima u stanicama mozga štakora povećava oksidacijski stres (192). Moguće štetno djelovanje AdoMet-a prisutno je i kod nedostatne aktivnosti jedne od metiltransferaza, glicin N-metiltransferaze (GNMT) (193). Nedostatna aktivnost GNMT-a u ljudi karakterizirana je značajnim povišenjem koncentracije AdoMet-a u plazmi (do 30 puta), a bez značajnog povišenja AdoHcy-a te uz značajno povećan metilacijski potencijal. U osoba koje imaju manjak GNMT-a nalazimo one asimptomatske, koje imaju samo blago povećane aminotransferaze, ali je opisan i bolesnik sa blagom fibrozom jetre. Knockout miš za GNMT oboljeva od hepatocelularnog karcinoma što može biti dokaz povezanosti povišenih koncentracija AdoMet-a i karcinogeneze (194).

Opisano je i štetno djelovanje visokih koncentracija AdoMet-a i kod nedostatka enzima L-izoaspartil (D-aspartyl) O-metiltransferaze (PCMT1) (195). Navedena metiltransferaza je enzim koji „popravlja“ proteine pretvarajući D-aspartil i L-izoaspartil u L-aspartil koristeći AdoMet kao donora metilne skupine. U *knockout* PCMT1-miša, kao i u heterozigotnog PCMT1-miša nađene su u mozgu (naročito hipokampusu) značajno više koncentracije AdoMet-a i niže koncentracije AdoHcy-a u odnosu na divlji tip. Navedeno je pojačalo ekscitatornost neurona i dovelo do pojave epilepsije i u *knockout* miša i u heterozigotnog PCMT1-miša.

Za sada se povišene koncentracije AdoMet-a nisu povezivale s pojavom prirodene srčane greške. No, poznato je da u bolesnika s nedostatnom aktivnosti adenzin kinaze postoji povećana mogućnost pojavnosti prirodene srčane greške (145,146). Naime u devet od devetnaest dosad opisanih bolesnika s manjkom ADK-a opisana je prirodena srčana greška. Svi bolesnici s manjkom ADK-a imaju povišene koncentracije AdoMet-a (2 do 20 puta) i AdoHcy-a (5 do 30 puta) u plazmi, pri čemu je metilacijski potencijal u plazmi u većine bolesnika unutar fizioloških granica. Koncentracije Hcy-a su istovremeno normalne ili blago povišene u ovih pacijenata. S obzirom na prisustvo prirodene srčane greške u 47% do sad prepoznatih osoba s manjkom ADK-a, moguće je da visoke koncentracijama AdoHcy-a i AdoMet-a u plazmi zajedno s visokim koncentracijama adenzina povećavaju mogućnost nastanka prirodene srčane greške (145,146).

Iz navedenog je vidljivo nije moguće sa sigurnošću zaključiti imaju li povišene koncentracije AdoMet-a značajan utjecaj na pojavnost prirodnih srčanih grešaka. Nedvojbeno je pojava prirodene srčane greške u novorođenčeta rezultat složenih bioloških procesa koji uključuju brojne metaboličke reakcije, epigenetičkih promjena i njihovog međusobnog odnosa. Povećane koncentracije AdoHcy-a u plazmi i snižen metilacijski potencijal u majki je, čini se, jedan od čimbenika koji uzrokuje prirodenu srčanu grešku u novorođenčeta, dok se za povećanje AdoMet-a u novorođenčadi ne može reći ima li i koliko udjela u pojavi prirodene srčane greške. Daljnja istraživanja bila bi potrebna kako bi se rasvijetlio utjecaj poremećaja metilacije na pojavu prirodene srčane greške.

6.3. ČIMBENICI KOJI MOGU UTJECATI NA KONCENTRACIJE S-ADENOZILMETIONINA I S-ADENOZILHOMOCISTEINA I PROMJENU METILACIJSKOG POTENCIJALA

6.3.1. Utjecaj dobi na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala

Već tijekom određivanja referentnih vrijednosti koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i njihovog omjera u novorođenčadi bilo je uočeno postojanje statistički značajne razlike između novorođenčadi i odraslih osoba. Koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a statistički su značajno više u novorođenačkoj dobi u odnosu na odrasle. Medijan koncentracije AdoMet-a je oko 2,2 puta veći u novorođenačkoj dobi u odnosu na onaj u žena reproduktivne dobi, a medijan koncentracije AdoHcy-a oko 5,3 puta veći. Posljedično je i metilacijski potencijal oko 2,3 puta manji u novorođenačkoj dobi u odnosu na metilacijski potencijal u odrasloj dobi.

Također je unutar referentne i ispitivane skupine novorođenčadi moguće vidjeti ovisnost koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala o danima života. Postoji statistički značajna korelacija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u odnosu na dane života - što je novorođenče mlađe to su koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a više, a metilacijski potencijal niži. S tjednima života koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a opadaju, a metilacijski potencijal raste.

Uvidom u literaturu nismo našli studije u kojima su izmjerene koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi u novorođenačkoj dobi. No, Imbard i suradnici su izmjerili koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u amnijskoj tekućini te pokazali značajan rast koncentracija navedenih metabolita tijekom trudnoće s maksimalnim vrijednostima između 33. tjedna i 40. tjedna trudnoće (196). Koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u amnijskoj tekućini u zadnja dva mjeseca trudnoće su više u odnosu na koncentracije u našoj referentnoj skupini novorođenčadi (u amnijskoj tekućini medijan AdoMet-a 323 nmol/L, medijan AdoHcy-a 126,1 nmol/L, medijan MI 2,7, u plazmi novorođenčadi iz naše referentne skupine medijan AdoMet-a 184 nmol/L, medijan AdoHcy-a 81,5 nmol/L, medijan MI 2,35) te zaključujemo da već po porodu dolazi do

smanjenja koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u odnosu na koncentracije u zadnjem tromjesječju trudnoće.

Brojne studije pokazale su također utjecaj dobi na koncentraciju homocisteina u plazmi; koncentracije homocisteina se povećavaju usporedno s godinama života te se do kraja života gotovo udvostruče u odnosu na prosječnu dob (197,198). Primjerice, Febriani i suradnici su mjerili homocistein iz suhe kapi krvi HPLC-metodom s detekcijom fluorescencije te našli značajnu razliku u koncentraciji homocisteina ovisno o dobi: u nedonoščeta koncentracija je iznosila $1,5 \pm 1,6$ $\mu\text{mol/l}$, u novorođenčeta $2,5 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/l}$, a u odrasle osobe $4,9 \pm 1,0$ $\mu\text{mol/L}$ (199).

Razlog nižim vrijednostima homocisteina, a višim AdoMet-a i AdoHcy-a može se potražiti u činjenici da je u novorođenčadi stupanj remetilacije homocisteina u metionin značajno veći u odnosu na odrasle (200,201). Transsulfuracija homocisteina je također puno izraženija u novorođenačkoj dobi u odnosu na odrasle, naročito u prvih 48 sati života, dok je u nedonoščeta čak do 5 puta veća u odnosu na donošenu novorođenčad (201). Pojačana transsulfuracija i remetilacija homocisteina u metionin mogu biti povezane s visokim potrebama za metilacijom s obzirom na proliferaciju stanica, rast i sintezu DNA (202). Također jedan od mogućih razloga pojačane aktivnosti cistation β -sintetaze mogu biti velike potrebe za glutationom i kreatinom (203). Postoji mogućnost i da je metionin adenziltransferaza II (MAT II) koja je aktivna u fetalno doba još neko vrijeme aktivna nakon rođenja, a nakon toga se njezina aktivnost postepeno smanjuje što rezultira i postepenim smanjenjem koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u prvim tjednima života (202). U prilog tome govore više koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u amnijskoj tekućini u zadnja dva mjeseca trudnoće u odnosu na koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi po porodu.

6.3.2. Utjecaj spola na koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina i promjenu metilacijskog potencijala

U ispitivanoj skupini, kao ni u referentnoj skupini novorođenčadi nismo našli značajne razlike u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskom potencijalu s obzirom na spol

novorođenčeta. Koncentracija AdoMet-a je doduše bila minimalno povećana u ženskog spola u odnosu na muški, ali ne statistički značajno.

Dosadašnje studije su pokazale da su koncentracije homocistena više u muškog spola u odnosu na ženski (197,198), dok se podaci za koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a značajno razlikuju. U istraživanju Huoa i suradnika (80) koje je obuhvatilo 310 ispitanika i ispitanica koncentracija AdoMet-a u žena je bila čak 28% viša nego u muškaraca, dok su u istraživanju Stablera i Allena učinjenom na puno manjem broju ispitanika (48 ispitanika) koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a više u muškaraca nego u žena (ali ne statistički značajno), dok je metilacijski potencijal viši u žena nego u muškaraca (204). Razlika u koncentraciji AdoMet-a, AdoHcy-a i Hcy-a može se objasniti činjenicom da muškarci i žene imaju različite koncentracije hormona i stoga značajno različit metabolizam (205). Kliničko istraživanje Sarris i suradnika (206) koje je procjenjivalo uspješnost terapije AdoMet-om u liječenju depresije pokazalo je da je terapijska primjena AdoMet-a značajno učinkovitija u muškaraca, što s obzirom na istraživanje Huoa i suradnika (80) može biti posljedica prosječno nižih koncentracija AdoMet-a u plazmi muškaraca u odnosu na žene.

6.3.3. Usporedba S-adenozilmationina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u ispitivanoj skupini u odnosu na mortalitet

S obzirom na visoki mortalitet (21%) u ispitivanoj skupini novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama postavlja se pitanje postoji li razlika u koncentraciji AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskom potencijalu u ispitanika u kojih je nastupio smrtni ishod u odnosu na one koji su u trenutku analiziranja uzoraka bili živi. Ustanovljeno je da su i AdoHcy i AdoMet bili statistički značajno viši u ispitanika u kojih je nastupio smrtni ishod u odnosu na ostatak ispitivane skupine, no nije bilo statistički značajne razlike u metilacijskom potencijalu.

Postavlja se pitanje je li ta razlika posljedica težeg stanja te novorođenčadi u odnosu na ostale ispitanike što je sekundarno dovelo do značajnijeg poremećaja metilacije ili su možda lošijem stanje ovih ispitanika doprinjele i više koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a. U prilog tezi da povišene koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a mogu doprinjeti većoj smrtnosti govori činjenica da je u pacijenata u terminalnom stadiju kronične renalne bolesti u kojih se u velikom

postotku nalazi hiperhomocisteinemija, vjerojatnost smrtonosnih kardiovaskularnih komplikacija poput infarkta miokarda, moždanog udara i/ili tromboembolije značajno veća nego u zdrave populacije (207). Naime, u 90% pacijenata s uremijom prisutne su visoke koncentracije homocisteina u plazmi; što su one više, to je rizik od nastanka navedenih komplikacija i posljedičnog smrtnog ishoda veća. Perna i suradnici su predložili mehanizam „nebalansirane metilacije” kao glavni čimbenik veće smrtnosti u uremiji (208). Pretpostavljaju da posljedično nakupljanje AdoHcy-a u hiperhomocisteinemiji dovodi do inhibicije onih metiltransferaza koje osjetljivije na djelovanje AdoHcy-a. Metiltransferaze koje su manje osjetljive na inhibiciju s AdoHcy-em će i dalje upotrebljavati AdoMet i producirati AdoHcy što će dovesti do daljnje inhibicije metiltransferaza osjetljivijih na djelovanje AdoHcy-a. U prilog tome govori činjenica da je sveukupna metilacija u pacijenata na dijalizi smanjena u odnosu na zdrave (209). Perna i suradnici misle da je navedenim mehanizmom ometen o metilaciji ovisan popravak membrane eritrocita u dijaliziranih pacijenata (210).

Također, proteini plazme u hemodijaliziranih pacijenata pokazuju značajno više ostatnih skupina L-izoaspartila što upućuje na njihovo značajno oštećenje u odnosu na proteine plazme u zdravih osoba. Nihov popravak je onemogućen zbog oslabljenog djelovanja AdoHcy-em inhibiranih metiltransferaza (210). Povećano oštećenje proteina, uz uremiju i hipometilaciju, dovode do oslabljenog vezivanja homocisteina za deaminirani albumin i povećanja koncentracije homocisteina.

Moguće je da više koncentracije AdoHcy-a doprinose većem riziku od kardiovaskularnih komplikacija i posljedično većoj mogućnosti nastanka smrtnog ishoda i u naših ispitanika, pogotovo jer se radi o pacijentima koji sami po sebi, s obzirom na hemodijalizu prirođenih srčanih grešaka, a zatim i na operativne zahvate kojima su podvrgnuti, imaju veći rizik od istih.

6.3.4. Postoji li razlika u koncentracijama S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijskog potencijala u novorođenčadi s prirođenom srčanim greškama i u njihovih majki između pojedinih skupina prirodnih srčanih grešaka prema etiopatogenetskoj podjeli po Clarku

Uspoređivali smo skupinu ispitanika s poremećajem migracije neuroektoderma u mezenhimalnu osnovu za srce (skupina s konotrunkalnim anomalijama) s ostalim skupinama s obzirom na etiopatogenetsku podjelu prema Clarku. Između te skupine i skupine s poremećajima intrakardijalnog protoka kao skupine s najvećim brojem ispitanika usporedbom koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala nije bilo značajne razlike. Ostale skupine su imale mali broj ispitanika, no iskaču ispitanici s poremećajem izvanstaničnog matriksa (2 ispitanika) koji su imali statistički značajno više koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi u odnosu na ostale skupine, no nije bilo statistički značajne razlike u metilacijskom potencijalu. Njihove majke su pak imale najniži metilacijski potencijal u odnosu na ostale skupine, ali ne statistički značajno.

Poremećaje izvanstaničnog matriksa najčešće imaju pacijenti s Downovim sindromom (potpuni AV kanal, parcijalni AV kanal) u kojih se opisuju značajni poremećaji metilacije. U istraživanju Obermann-Borst i suradnika (104) djeca s prirođenim srčanim greškama u sklopu Downovog sindroma imala su više koncentracije AdoMet-a, AdoHcy-a te niži metilacijski potencijal u odnosu na nesindromsku djecu koja imaju prirođenu srčanu grešku i u odnosu na djecu koja imaju srčanu grešku u sklopu drugih sindroma. Ispitivanje većeg broja bolesnika s poremećajima izvanstaničnog matriksa moglo bi pokazati u kojoj su mjeri povećane koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a čimbenici rizika za pojavu ove vrste prirođene srčane greške i je li poremećaj metilacije također čimbenik rizika.

Utjecaj mogućeg poremećaja metilacije u početku se povezivao samo s konotrunkalnim anomalijama. Shaw i suradnici su još 1995. godine našli 30% smanjenje konotrunkalnih anomalija u djece majki koje su u ranoj trudnoći uzimale folnu kiselinu (211), što je potvrđeno istraživanjima Bottoa i suradnika (212) u kojem se rizik nastanka konotrunkalne srčane greške smanjio čak za 43% ukoliko je majka uzimala multivitaminske preparate koji sadrže folnu kiselinu i vitamin B₁₂. Hobbs i suradnici su, nakon što su pokazali da majke djece s prirođenim

srčanim greškama imaju značajno veću koncentraciju homocisteina u plazmi, pokušali utvrditi postoji li jače izražena povezanost određenih skupina prirođenih srčanih greška s poremećajem metilacije (23). Podijelili su ispitanice u pet kategorija (majke djece s konotrunkalnim malformacijama, septalnim defektima, opstruktivnim lijevostranim malformacijama, opstruktivnim desnostranim malformacijama i složenim srčanim greškama). Ispitanice su u svim kategorijama imale statistički značajno veću koncentraciju homocisteina u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije bilo razlike među skupinama. Majke djece sa septalnim defektima, opstruktivnim lijevostranim i opstruktivnim desnostranim malformacijama imale su nižu koncentraciju metionina u odnosu na kontrolnu skupinu. Jedino su majke djece s opstruktivnim desnostranim malformacijama imale nižu koncentraciju folne kiseline u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu.

Imavši na umu prijašnja istraživanja koja su upućivala na značajnu povezanost konotrunkalnih malformacija s primjenom folne kiseline (211,212), očekivali smo da će poremećaji metilacije biti više povezani s tom vrstom malformacija. No, ako isključimo dva ispitanika s poremećajem izvanstaničnog matriksa i njihove majke, u naših ispitanika nismo našli jače izraženu povezanost određenih skupina prirođenih srčanih greška s poremećajem metilacije. Naši su rezultati sukladni s rezultatima Hobbs i suradnika (23) u kojih nije bilo razlike u koncentraciji homocisteina među skupinama.

6.3.5. Utjecaj drugih faktora u majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom na koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal

U majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama nismo našli značajne razlike u koncentracijama AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskom potencijalu s obzirom na pojavnost spontanih pobačaja, mrtvorodne djece te prisustvo srčane greške u braće i sestara.

No, u ispitanica se nalazi veća učestalost spontanih pobačaja u odnosu na prosjek u Hrvatskoj u 2016. i 2017. godini. Naime, čak 19% ispitanica (20/104) imalo je klinički spontani ili medicinski inducirani pobačaj, dok je učestalost spontanih i medicinski induciranih pobačaja u Hrvatskoj bila 2016. godine 3347 na 42690 evidentiranih trudnoća (7,8%) (213,214) a 2017. godine 3729 na 42875 (8,7%) evidentiranih trudnoća (215,216). Poznato je da niže koncentracije

folne kiseline u plazmi dovode do veće incidencije spontanih pobačaja (87). Nekoliko istraživanja je pokazalo da više koncentracije homocisteina u plazmi dovode do veće učestalosti spontanih pobačaja, gubitka ploda u drugom i trećem tromjesječju, veće učestalosti mrtvorodne djece te veće učestalosti rađanja nedonoščadi (217,218). Stoga je za očekivati i da će više koncentracije AdoHcy-a u majki dovesti do veće učestalosti spontanih pobačaja, tj. da će čimbenik koji doprinosi većoj pojavnosti prirodene srčane greške doprinijeti i većoj učestalosti spontanog pobačaja u istih žena, što je i potvrđeno u našem istraživanju.

Broj mrtvorodjenih u RH u 2016. godini iznosi 181 na 42690 (0,42%) evidentiranih trudnoća (213), a u 2017. godini 149 na 42875 (0,35%) evidentiranih trudnoća (215). Dvije ispitanice rodile su mrtvorodjenče (2/102) što je nešto učestalije nego bi se moglo očekivati s obzirom na učestalost u RH, no uzorak ispitanica je premali da bismo sa sigurnošću došli do zaključka da će više koncentracije AdoHcy-a te niži metilacijski potencijal u majki dovesti do veće učestalosti mrtvorodne djece. Veći broj mrtvorodjenih moguć je zbog učestalijih komplikacija u trudnoći majki s visokim koncentracijama homocisteina u vidu češće abrupcije placente, preeklampsije i češćih hipertenzivnih kriza (218).

U istraživanju Dilbera i Malčića navedeno je da u periodu od 2002. do 2007. godine 4,1% djece s prirođenim srčanim greškama upisanih u hrvatski registar prirođenih srčanih grešaka imaju u obitelji osobu s već prije dijagnosticirano srčanom greškom (5). Također se zna da je rizik za drugo dijete u obitelji ukoliko jedno dijete već ima prirodenu srčanu grešku 2 do 6% (5,6). U 8 do 127 naših ispitanika (6%) uz ispitanika u obitelji postoji još jedno dijete koje boluje od srčane greške, što je u skladu s očekivanim. U tih ispitanika nisu nađena značajna odstupanja koncentracija AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u odnosu na ostale ispitanike.

6.3.6. Utjecaj primjene folne kiseline u prvom tromjesječju trudnoće na koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i njihovih majki

Većina majki ispitanica nije uzimala folnu kiselinu u prvom tromjesječju (92/127). Samo 11% majki ispitanica (14/127) je počelo s primjenom folne kiseline prije začeća i primjenjivalo je tijekom prvog tromjesječja, dok je 16% (21/127) majka ispitanica uzimalo folnu kiselinu, ali

neadekvatno (započele su s primjenom folne kiseline između petog i osmog tjedna trudnoće). Doza folne kiseline koju su ispitanice uzimale također se razlikovala i u više od 50% slučajeva je bila deseterostruko viša u odnosu na preporučenu. Usporedbom AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u majki koje su uzimale folnu kiselinu (adekvatno i neadekvatno) u odnosu na majke koje nisu uzimale folnu kiselinu nije nađena statistički značajna razlika. No, novorođenčad majki koje nisu uzimale folnu kiselinu imala su statistički značajno viši AdoMet u odnosu na novorođenčad majki koja su uzimala folnu kiselinu, dok AdoHcy i metilacijski potencijal nisu bili statistički značajno različiti.

Naše bi istraživanje trebalo proširiti na mjerenje koncentracije folne kiseline u ispitanih skupina kako bismo sa sigurnošću mogli reći postoji li nedostatak folne kiseline u plazmi majki koji dovodi do povećanja mogućnosti nastanka prirođene srčane greške.

Neprimjena folne kiseline u perikonceptijskom razdoblju u čak 73% ispitanica je poražavajući podatak i definitivno je mogući razlog nastanka srčane greške u novorođenčadi tih ispitanica, čemu idu u prilog prije navedena istraživanja (26,27,96). U prilog važnosti folne kiseline u srčanoj morfogenezi govori i istraživanje Tanga i suradnika (219) u kojem miš s manjkom membranskog proteina Folbp1 umire intrauterino zbog multiplih malformacija, uključujući složene srčane greške. Folbp1 je protein putem kojeg se u miša transportira folna kiselina. Smanjena dostupnost folne kiseline u ovog miša dovodi do smanjene migracije stanica neuralnog grebena, prerane smrti stanica uzrokovane apoptozom i smanjenog kapaciteta proliferacije kardiomiocita. Navedeno je rezultiralo pojavom srčane greške u svih miševa s manjkom membranskog proteina Folbp1 koja se očitovala smanjenim volumenom klijetki, neadekvatnim septiranjem klijetki, perzistentnim trunkusom arteriosusom i dvostrukim izlazom krvnih žila iz desne klijetke. No, nakon nadoknade folne kiseline u visokim koncentracijama navedeni *knockout* miš nije imao veću pojavnost složene srčane greške u odnosu na divlji tip miša.

Dnevna doza folne kiseline preporučena za prevenciju nastanka rascjepa neuralne cijevi i prirođene srčane greške iznosi 400 μg i trebala bi se primjenjivati u razdoblju od četiri tjedna prije planirane trudnoće i svakako barem do dvanaestog tjedna trudnoće (220,221). To se teško postižu uobičajenom prehranom pa je potreban unos putem dodataka prehrani ili obogaćivanjem

hrane koja dopire do najšireg dijela stanovništva. Danas veliki broj zemalja u svijetu sustavno obogaćuje žitarice folnom kiselinom (220). Zemlje Europske unije nemaju zajednički zakon o obaveznom obogaćivanju hrane folnom kiselinom, već se ono provodi samo u nekim zemljama (220,221). U Hrvatskoj još uvijek nema službenih smjernica o načinu uzimanja folne kiseline prije i za vrijeme trudnoće, kao niti obogaćivanja hrane mikronutrientima, već primjena ovisi o preporukama osobnih liječnika obiteljske medicine i ginekologa. Tako su naše ispitanice samo u 11% posto slučajeva uzimale folnu kiselinu u periodu od mjesec dana prije začeća do dvanaestog tjedna trudnoće, dok je njih 16% uzimalo folnu kiselinu u periodu od pet do osam tjedana trudnoće do dvanaest tjedana trudnoće (nakon što su saznale da su trudne i prvi put posjetile ginekologa). Veliki dio njih (18/35) uzimao je doze desetorostruko veće od preporučenih za nerizičnu populaciju (5 mg), a prema uputama svojih ginekologa.

Istraživanja provedena zadnjih godina dovela su do zabrinutosti zbog mogućeg učinka visokih koncentracija folne kiseline u plazmi na veću pojavnost karcinoma, slabljenje kognitivnih sposobnosti i slabljenje imunosne funkcije (222). Naime, nakon obogaćivanja hrane folnom kiselinom, koncentracija folne kiseline u serumu u populaciji SAD-a je narasla 2,5 puta, dok je povećanje koncentracije folne kiseline u serumu nakon trodnevnog uzimanja 5 mg folne kiseline bilo i petnaestorostruko (223). U istraživanju Pickella i suradnika pokazano je da desetorostruko veći unos folne kiseline od preporučene u *Mthfr knockout* miša dovodi do veće incidencije spontanog pobačaja, zastoja u rastu, smanjenja debljine stijenke ventrikla te dvostruko veće pojavnosti VSD-a u odnosu na miševe hranjene preporučenim dozama folne kiseline (224). Moguće je da je uzimanje visokih doza folne kiseline u 18 naših ispitanica, umjesto da djeluje protektivno, doprinijelo nastanku prirođene srčane greške u njihove novorođenčadi. Mada je naš uzorak veoma mali (104 ispitanice), možemo svejedno zaključiti da je neophodno potrebno donijeti službene smjernice o načinu uzimanja folne kiseline prije i za vrijeme trudnoće.

6.3.7. Utjecaj primjene vitamina B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće na koncentracije S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i metilacijski potencijal u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i njihovih majki

Većina majki ispitanica nije uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju (110/127). Samo 5% majki ispitanica (6/127) je počelo s primjenom vitamina B₁₂ (u sklopu multivitaminskih preparata) prije začeća i primjenjivalo ga tijekom prvog tromjesečja, dok je 19% (11/127) majki ispitanica uzimalo vitamin B₁₂, ali neadekvatno (započele su s primjenom vitamina B₁₂ između petog i osmog tjedna trudnoće). Usporedbom AdoMet-a, AdoHcy-a i metilacijskog potencijala u majki koje su uzimale vitamin B₁₂ (adekvatno i neadekvatno) u odnosu na majke koje nisu uzimale vitamin B₁₂ nije nađena statistički značajna razlika. Novorođenčad majki koje nisu uzimale vitamin B₁₂ imala su viši AdoMet i AdoHcy u odnosu na novorođenčad majki koja su uzimala vitamin B₁₂, ali ne na razini statističke značajnosti. Usporedbom metilacijskog potencijala također nije nađena statistički značajna razlika između novorođenčadi majki koje su uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće i novorođenčadi majki koja nisu uzimala vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće.

S obzirom na značajnu povezanost nedostatka vitamina B₁₂ u perikonceptijskom razdoblju s nastankom rascjepa neuralne cijevi (97,98), isti se navodi kao jedan od čimbenika veće mogućnosti nastanka konotrunkalnih prirođenih srčanih greški, mada nema istraživanja koje to može sa sigurnošću potvrditi. Nedostatak vitamina B₁₂, kofaktora za metionin sintetazu (enzima koji sudjeluje u remetilaciji homocisteina u metionin), dovodi do povećanja koncentracije homocisteina u plazmi. Stoga se pretpostavlja da manjak vitamina B₁₂ u majke u perikonceptijskom razdoblju dovodi do veće pojavnosti srčane greške u potomaka.

Potrebno je izmjeriti koncentracije vitamina B₁₂ u ispitanih skupina kako bismo sa sigurnošću mogli reći postoji li njegov nedostatak u plazmi majki koji dovodi do povećanja mogućnosti nastanka prirođene srčane greške. S druge strane, broj ispitanica koje su uzimale vitamin B₁₂ prekonceptijski je relativno mali te je moguće da bi rezultati bili drugačiji na većem uzorku ispitanika.

6.4. POUZDANOST TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI I TANDEMSKE SPEKTROMETRIJE MASA ZA MJERENJE KONCENTRACIJA S-ADENOZILMETIONINA I S-ADENOZILHOMOCISTEINA U PLAZMI

AdoMet i AdoHcy imaju razmjerno niske koncentracije u plazmi (između 10 i 100 nmol/L). Njihovo je mjerenje zahtjevno i dugotrajno. Uz to, AdoMet je izrazito nestabilan spoj koji se djelomično degradira u AdoHcy u uzorcima koji nisu odmah tretirani i koji nisu pohranjeni na minimalno -20°C. Unazad desetak godina mjerenje AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa postalo je standardna metoda te je u sklopu ove disertacije metoda uvedena i u naš laboratorij. Izvodi je samo nekoliko laboratorija u Europi. U odnosu na prije korištene metode navedena zahtijeva kraće vrijeme pripreme uzorka (oko deset uzoraka u 30 minuta) te vrijeme mjerenja koncentracije oko osam i pol minuta, što omogućava obradu od 100-tinjak uzoraka u jednom danu.

Uzorci sakupljeni za potrebe ovog istraživanja skupljeni su i analizirani unutar dvije godine. Svaki uzorak je bio tretiran octenom kiselinom unutar 30 minuta nakon vađenja uzorka i centrifugiranja kako bi se spriječila degradacija AdoMet-a u AdoHcy. Kad bi stabilnost uzoraka bila neadekvatna, očekivali bismo da se uslijed neenzimske razgradnje smanji koncentracija AdoMet-a, a povisi koncentracija AdoHcy-a te snizi metilacijski potencijal. Dobra pozitivna korelacija koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u ispitanika te linearnost korelacije ne upućuje na neenzimsku razgradnju analita. Stoga možemo zaključiti da su uzorci bili stabilni i da su izmjereni rezultati pokazatelj njihove primjerene kvalitete te da je metoda mjerenja AdoMet-a i AdoHcy-a ponovljiva i pouzdana za ispunjenje ciljeva ove disertacije.

6.5. UČESTALOST POLIMORFIZAMA RS13043752 (112 C>T) I RS41301825 (377 G>A) GENA *AHCY* U ISPITIVANIM SKUPINAMA

Dokazano je da polimorfizmi SAHH-2 i SAHH-3 gena *AHCY* utječu na termalnu stabilnost enzima SAHH *in vitro* (160). Postoji mogućnost da termolabilnost navedenih izoformi *in vivo* može nepovoljno djelovati na aktivnost proteina. Za pretpostaviti je da je njihov utjecaj značajan i u uvjetima *in vivo* te je moguće da osobe koje su nositelji ovih polimorfizama ili čije su majke nositelji ovih polimorfizama imaju veći rizik za razvoj prirođene srčane greške. Stoga je ispitana učestalost navedenih polimorfizama u 116 novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u 94 njihovih majki. Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti polimorfizama SAHH-1 i SAHH-2 gena *AHCY* u ispitivanim skupinama u odnosu na zdrave ispitanike. Stoga zaključujemo da ovi polimorfizmi nisu češći u populaciji ispitanika - novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u njihovih majki u odnosu na zdrave osobe. No, s obzirom na relativno malen broj ispitanika koji je bio testiran za navedene polimorfizme, za potvrdu ovih rezultata trebalo bi testirati veći broj ispitanika.

Premda navedeni polimorfizmi nisu češći u skupini novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama ni u njihovih majki, nije isključeno da njihovo prisustvo dodatno utječe na patološke procese unutar stanice. U prilog tome govore viši metilacijski potencijal i više koncentracije AdoMet-a u plazmi novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom s polimorfizmom SAHH-2 i niži metilacijski potencijal te više koncentracije AdoHcy-a u plazmi majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom u odnosu na ispitanike koji nemaju navedeni polimorfizam.

Kao što je već navedeno u uvodu, tijekom zadnjih dvadesetak godina polimorfizme mnogih gena koji sudjeluju u ciklusu folata i ciklusu metionina pokušalo se nametnuti kao čimbenik rizika za nastanak prirođenih srčanih grešaka. Opisana je povezanost mutacija gena *MTHFR* 677C>T i 677T>T u majki s većom pojavnost složenih srčanih grešaka u potomaka (113-116), s tim da pojavnost postaje statistički značajno uvećana tek ukoliko postoje dodatni čimbenici okoline kao što je niska koncentracija folne kiseline u plazmi majke (118), povećan BMI (118) te ukoliko majke puše (119). Ispitivana je i povezanost veće pojavnosti prirođenih srčanih grešaka u djece koja imaju mutaciju 677T>T gena *MTHFR*. Većina studija nije dokazala povezanost navedene mutacije i veće pojavnosti prirođene srčane greške (117,121), osim

istraživanja Junkera i suradnika koji su pokazali dvostruko veću pojavnost navedene mutacije u djece s prirođenom srčanom greškom u odnosu na zdravu populaciju (120). Mutacija 1298A>C gena *MTHFR*, bilo u majki djece sa prirođenom srčanom greškom bilo u same djece, nije pokazala utjecaj na veću pojavnost prirođene srčane greške (122). Mutacija gena *BHMT* G716GA nije povezana s većom pojavnošću prirođene srčane greške (113,117) osim ukoliko je majčin BMI bio veći od 30 prije početka trudnoće; tada je rizik gotovo dvostruki (117). Mutacija 776C>G gena za TCII nije povezana s većom pojavnošću prirođene srčane greške (118) osim ukoliko je majka tijekom trudnoće pušila i/ili konzumirala alkohol (118). Mutacije gena *MTRR* u djece povezane su s 1,5 puta većom pojavnošću prirođene srčane greške (143).

Perikonceptijska primjena folne kiseline anulira rizik veće pojavnosti prirođene srčane greške u djece majki koje imaju mutacije gena *MTHFR* 677C>T i 677T>T. Sve ispitanice u našem istraživanju koje imaju polimorfizam SAHH-2 ili čija novorođenčadi ima polimorfizam SAHH-2 nisu u perikonceptijskom periodu uzimale ni vitamin B₁₂ ni folnu kiselinu ili su uzimale folnu kiselinu neadekvatno. Stoga je moguće da prisustvo navedenih polimorfizama uz dodatne čimbenike kao što je niska koncentracija folne kiseline i/ili vitamina B₁₂ u plazmi majke ili pak uz već prije prepoznate čimbenike kao što su viši BMI majke, pušenje ili primjena alkohola, rezultira višim metilacijskim potencijalom i višim koncentracijama AdoMet-a u plazmi novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i nižim metilacijskim potencijalom te višim koncentracijama AdoHcy-a u plazmi majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom. Dodatna obrada u vidu određivanja koncentracija folne kiseline i vitamina B₁₂ u plazmi ispitanika i spitanica s polimorfizmom SAHH-2 doprinijet će boljem razumijevanju utjecaja navedenog polimorfizma na metilacijske procese u ovih ispitanica.

7. ZAKLJUČCI

1. U skupini ispitivane novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom dokazali smo statistički značajno povišenu koncentraciju AdoMet-a u odnosu na referentnu skupinu. Je li to mogući čimbenik koji postoji u tkivima i *in utero* u trenutku nastajanja prirodene srčane greške i povisuje rizik njezine pojave ili mogući kompenzacijski mehanizam poremećene metilacije u majki ili je uzrok tome neki treći razlog ne može se zaključivati bez dodatnih istraživanja.
2. Iako nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji AdoHcy-a između skupine ispitivane novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i referentne skupine, u 12% ispitanika je koncentracija AdoHcy-a bila viša od gornje referentne vrijednosti što znači da bi u nekih bolesnika, ako pojava postoji u tkivima i *in utero* u trenutku nastajanja srčane greške, to mogao biti čimbenik koji remeti metilaciju i možda pridonosi nastanku prirodene srčane greške.
3. U skupini ispitivane novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom statistički je značajno veći metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ustanovilo može li ta pojava, ako postoji u tkivima i *in utero* u trenutku nastajanja srčane greške, pridonositi pojave srčane greške ili je samo popratna pojava odnosno reakcija na poremećenu metilaciju u majke u vrijeme trudnoće.
4. U skupini ispitivanih majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom dokazali smo statistički značajnu višu koncentraciju AdoHcy-a u odnosu na referentnu skupinu bez statistički značajne razlike u koncentraciji AdoMet-a, što upućuje da bi povišena koncentracija AdoHcy-a u trudnica mogla biti čimbenik koji pridonosi nastanku prirodene srčane greške.
5. U skupini ispitivani majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom dokazali smo statistički značajno manji metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu, pa bi manji metilacijski potencijal uzrokujući posljedični poremećaj metilacije mogao biti čimbenik rizika za pojavu prirodene srčane greške u ploda takvih majki.
6. U prva četiri tjedna života i u novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u referentnoj skupini novorođenčadi koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a postepeno postaju

niže, a metilacijski potencijal viši, pa se naši rezultati sugeriraju da tijekom novorođenačke dobi s vremenom opada koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a.

7. Koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi ispitanika novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i referentne skupine novorođenčadi ne razlikuje se s obzirom na spol.
8. Koncentracije AdoHcy-a i AdoMet-a su u plazmi ispitivane novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama u kojih je nastupio smrtni ishod bile statistički značajno više u odnosu na ostatak ispitivane skupine što upućuje da više koncentracije možda mogu biti prediktori lošeg ishoda.
9. U dvoje ispitivane novorođenčadi sa srčanim greškama zbog poremećaja izvanstaničnog matriksa i njihovih majki nađene su statistički značajno više koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi u odnosu na ostale skupine s obzirom na etiopatogenetsku raspodjelu prirođenih srčanih grešaka prema Clarku pa je moguće da u ovoj skupini srčanih grešaka promjene koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a imaju veći utjecaj na pojavu srčanih grešaka nego u drugim skupinama.
10. Naši rezultati ne sugeriraju da su plazmatske koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i njihovih majki povezane s prijašnjim spontanim pobačajima, rođenjem mrtvorodenčadi i drugim potomcima s prirođenim srčanim greškama.
11. Naši rezultati upućuju da novorođenčad s prirođenim srčanim greškama majki koje nisu uzimale folnu kiselinu u prvom tromjesečju trudnoće imaju statistički značajno viši AdoMet i viši, iako statistički ne značajno, AdoHcy u odnosu na novorođenčad s prirođenim srčanim greškama majki koje su uzimale folnu kiselinu. Usporedbom metilacijskog potencijala nije nađena statistički značajna razlika između ovih skupina. Na temelju naših rezultata na malom broju ispitanika u ovom segmentu istraživanja ne možemo zaključiti da folna kiselina utjecajem na ispitivane čimbenike metilacije smanjuje rizik pojave srčanih grešaka.
12. Nije nađena korelacija između koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi ispitanica majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i primjene folne kiseline u prvom tromjesečju trudnoće. S obzirom na mali broj ispitanika u ovom segmentu istraživanja ne možemo zaključiti da folna kiselina utjecajem na ispitivane čimbenike metilacije smanjuje rizik pojave srčane greške.

13. Broj ispitanica majki koje su uzimale vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće je toliko malen da se na temelju nepostojanja korelacije između koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi ispitanika novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama i primjene vitamin B₁₂ u prvom tromjesečju trudnoće ne može zaključivati o utjecaju vitamina B₁₂ na ispitivane čimbenike metilacije. Isto vrijedi i za nepostojanje korelacije između koncentracija AdoMet-a i AdoHcy-a u plazmi ispitivanih majki novorođenčadi s prirođenim srčanim greškama.
14. Budući da je samo 27% ispitivanih majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom uzimalo folnu kiselinu u prvom tromjesečju trudnoće i većina njih nije uzimala odgovarajuću dozu folne kiseline i/ili je počela s uzimanjem folne kiseline prekasno potrebno je donijeti službene smjernice u Republici Hrvatskoj o načinu uzimanja folne kiseline prije i za vrijeme trudnoće i probati ih provesti.
15. Polimorfizmi rs13043752 (112C>T) i rs41301825 (377G>A) gena *AHCY* nisu češći u ispitivanim skupinama u odnosu na zdrave ispitanike što sugerira da nisu udruženi s povećanim rizikom za pojavu prirođenih srčanih grešaka.

8. SADRŽAJ

Niti jedna prirođena srčana greška, neovisno o složenosti, nije poseban entitet, već je rezultat složene interakcije više ili manje poznatih embrioloških i genskih čimbenika, čimbenika okoline u perikonceptijskom razdoblju te majčinih životnih navika. Jedan od mogućih mehanizama nastanka jest poremećaj u metilaciji kako u majke, tako i u potomaka. U prilog toj tezi govori činjenica da su manjak folne kiseline i niže koncentracije vitamina B₁₂ u plazmi majke u perikonceptijskom razdoblju te posljedična majčina hiperhomocisteinemija čimbenici rizika za pojavu prirođene srčane greške u potomaka. Postavlja se pitanje je li homocistein sam po sebi čimbenik rizika ili su promjene koncentracije njegovih prethodnika u ciklusu metionina AdoMet-a i AdoHcy-a te promjene njihovog međusobnog omjera (metilacijskog potencijala) odgovorni za veću pojavnost prirođenih srčanih grešaka.

U ovoj je disertaciji prva hipoteza bila da će povišena koncentracija AdoMet-a u plazmi biti čimbenik rizika za pojavu prirođene srčane greške, druga hipoteza da će povišena koncentracija AdoHcy-a u plazmi biti čimbenik rizika za pojavu prirođene srčane greške. Treća hipoteza je bila da će novorođenčad s prirođenom srčanom greškom i njihove majke imati snižen metilacijski potencijal u odnosu na referentnu skupinu. Četvrta hipoteza je bila da će novorođenčad s prirođenom srčanom greškom i njihove majke imati različitu učestalost polimorfizama rs13043752 i rs41301825 gena *AHCY* u odnosu na zdrave ispitanike.

Da bismo provjerili hipoteze i ispunili ciljeve istraživanja testirali smo 127 novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i 103 majke novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u njih u plazmi metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa izmjerili AdoMet i AdoHcy te potom izračunali metilacijski potencijal. Učestalost polimorfizama rs13043752 i rs41301825 gena *AHCY* ispitali smo sekvenciranjem egzona 2, 3 i 4 gena *AHCY* u 116 novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom i u 94 majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom.

U skupini ispitanika novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom dokazali smo statistički značajno više koncentracije AdoMet-a u odnosu na referentnu skupinu. Nije bilo

statistički značajne razlike u koncentraciji AdoHcy-a. Metilacijski potencijal u ovoj skupini bio je posljedično statistički značajno viši. U skupini ispitanica majki novorođenčadi s prirođenom srčanom greškom dokazali smo statistički značajno povišene koncentracije AdoHcy-a u odnosu na referentnu skupinu, a nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji AdoMet-a. Metilacijski potencijal je u skladu s hipotezom bio statistički značajno niži.

Povišene koncentracije AdoMet-a odnosno AdoHcy-a koje su izmjerene u ispitivanim skupinama te statistički značajne razlike u vrijednostima metilacijskog potencijala u ispitivanim skupinama u odnosu na referentne vrijednosti upućuju na narušene procese metilacije što može pridonijeti patogenezi prirođenih srčanih grešaka. U disertaciji je obrazloženo na koji način promijenjen metilacijski potencijal te povišene koncentracije AdoMet-a i AdoHcy-a mogu utjecati na metilacijske procese unutar stanice i pridonositi povećanom riziku pojave srčanih grešaka.

Nije nađena statistički značajna razlika u prevalenciji polimorfizama rs13043752 i rs41301825 gena *AHCY* u ispitivanim skupinama u odnosu na zdrave ispitanike, što sugerira da nisu udruženi s povećanim rizikom za pojavu prirođenih srčanih grešaka.

Rezultati ovog istraživanja upućuju da poremećaji metilacije sudjeluju u patogenezi prirođenih srčanih grešaka. Daljnja istraživanja su potrebna da se utvrde točni patološki mehanizmi te stupanj poremećaja metilacije koji dovode do promjene u epigenetskom programiranju gena i drugih primatelja metilne skupine i posljedično do pojave prirodene srčane greške i promjene u programiranju metilacijskih procesa u fetusa.

9. SUMMARY

Concentration of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase gene polymorphisms in newborns with congenital heart diseases and their mothers

Dorotea Ninković, 2019.

The congenital heart disease is the consequence of complex interaction of more or less known embryological and genetic factors, the environmental factor in the periconceptual period and the mother's lifestyle habits. One of the possible mechanisms is derangement in methylation pathway, both in mothers and in children. This thesis supports the fact that the low availability of folic acid or vitamin B₁₂ in the periconceptual period and consequent mother's hyperhomocysteinemia are associated with the risk of having a child with congenital heart disease. The question is whether homocysteine itself is a risk factor or changes in methylation biomarkers S-adenosylmethionine (AdoMet) and S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) and methylation potential are responsible for a higher incidence of congenital heart disease.

The first hypothesis of this dissertation was that increased plasma concentrations of AdoMet is associated with an increased risk of congenital heart disease, another hypothesis that increased plasma concentrations of AdoHcy is associated with an increased risk of congenital heart disease. The third hypothesis was that newborns with congenital heart disease and their mothers would have decreased methylation ratio compared to referral group. The fourth hypothesis was that newborns with congenital heart disease and their mothers would have a different prevalence of the *AHCY* rs13043752 and rs41301825 polymorphisms, compared to healthy subjects.

In order to reach goals of this study, we included 127 newborns with congenital heart disease and 103 mothers of newborns with congenital heart disease and measured AdoMet and AdoHcy in their plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and then calculate their methylation potential. The prevalences of polymorphisms rs13043752

and rs41301825 of the *AHCY* gene were studied in examined group by sequencing *AHCY* gene exons 2, 3 and 4.

In the group of newborns with congenital heart disease we have found statistically significant increased AdoMet compared to the referral group. There was no statistically significant difference in the concentration of AdoHcy. Methylation potential in this group was consequently statistically significantly higher. In the group of mothers of newborn with congenital heart disease we have found statistically significant increased of AdoHcy compared to the referral group, but no statistically significant difference in the concentration of AdoMet. Methylation potential was statistically significantly lower, according to the hypothesis.

Increased concentrations of AdoMet or AdoHcy measured in our groups of examinees and statistically significant differences in the methylation potential values in our groups of examinees compared to the reference values point to changed methylation processes which can contribute to the pathogenesis of congenital heart disease. It is explained in the dissertation how changes in methylation potential and the increased concentration of AdoMet and AdoHcy may affect the methylation processes within the cell and contribute to increased risk of congenital heart disease.

There was no statistically significant difference in the prevalence of polymorphisms rs13043752 and rs41301825 of the *AHCY* genes in the study groups compared to healthy subjects, suggesting that they are not associated with increased risk of congenital heart disease.

The results of this study indicate that methylation disorders are involved in pathogenesis of congenital heart diseases. Further studies are needed to elucidate the exact mechanism by which disturbed methylation leads to changes in epigenetic programming of genes and other recipients of the methyl group and consequently to higher risk of congenital heart disease and changes in the programming of methylation processes in the fetus.

9. POPIS LITERATURE

1. Tennstedt C, Chaoui R, Korner H, Dietel M. Global distribution of specific birth defects. U: March of Dimes Birth Defects Foundation. Global report on birth defects: the hidden toll of dying and disabled children. March of Dimes Birth Defects Foundation, White Planes: New York; 2006, str. 28.
2. Bound JP, Logan WFWE. Incidence of congenital heart disease in Blackpool 1947-1971. *Br Heart J* 1977;39:445-50.
3. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1890-1900.
4. Hoffman JIE, Kaplan S, Liberthson RR. Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J* 2004;147:425-39.
5. Dilber D, Malčić I. Spectrum of congenital heart defects in Croatia. *Eur J Pediatr* 2010;169:543-550.
6. Botto LD, Correa A. Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. *Prog Pediatr Cardiol* 2003;18:111-21.
7. Kalter H, Warkany J. Medical progress. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention. *N Engl J Med* 1983;308:424-31.
8. Sylva M, van den Hoff MJ, Moorman AF. Development of the human heart. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1347-71.
9. Clark EB. Mechanisms in the pathogenesis of congenital heart defects. U: Pierpont ME, Moller J, ur. The genetics of cardiovascular disease. Martinus-Nijhoff: Boston; 1986, str. 3-11.
10. Clark EB. Pathogenetic mechanisms of congenital cardiovascular malformations revisited. *Semin Perinatol* 1996;20:465-72.
11. Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, Darlay R, Töpf A, Zelenika D, i sur. Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet* 2012;91:489-501.

12. Hitz MP, Lemieux-Perreault LP, Marshall C, Feroz-Zada Y, Davies R, Yang SW, i sur. Rare copy number variants contribute to congenital left-sided heart disease. *PLoS Genetics* 2012;8:e1002903.
13. Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW, Cheong SY, Feingold E, Allen EG, i sur. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. *Genet Epidemiol* 2010;34:613-2.
14. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 2002;132:2393-2400.
15. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 2011;43:768-75.
16. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4632-42.
17. Fradin D, Le Fur S, Mille C, Naoui N, Groves C, Zelenika D, i sur. Association of the CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. *PLoS One* 2012;e132. doi:10.1038/tp.2012.
18. Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, i sur. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J* 2012;31:1405-26.
19. Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry* 2012;2:e132; PMID:2276055.
20. Connor CM, Akbarian S. DNA methylation changes in schizophrenia and bipolar disorder. *Epigenetics* 2008;3:55-8.
21. Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW, Cheong SY, Feingold E, Allen EG, i sur. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. *Genet Epidemiol* 2010;34:613-23.
22. Bean LJH, Allen EG, Tinker SW, Hollis ND, Locke AE, Druschel C, i sur. Lack of maternal folic acid supplementation is associated with heart defects in down syndrome: a report from the national Down syndrome project. *Birth Defects Res: A Clin Mol Teratol* 2011;91:885-93.

23. Hobbs CA, Malik S, Zhao W, Zhao W, James SJ. Maternal homocysteine and congenital heart defects. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:683-5.
24. Kapusta L, Haagmans ML, Steegers EA, Cuypers MH, Blom HJ, Eskes TK. Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediatr* 1999;135:773-4.
25. Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem NT, Lindemans J, Helbing WA, Ottenkamp J. Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG* 2006;113:1412-8.
26. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Do multivitamin or folic acid supplements reduce the risk for congenital heart defects? Evidence and gaps. *Am J Med Genet A* 2003;121:95-101.
27. Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343:1608-14.
28. Mudd SH, Cantoni GL. Activation of methionine for transmethylation. The methionine-activating enzyme of Baker's yeast. *J Biol Chem* 1958;231:481-92.
29. Cantoni GL. Biological methylation: selected aspects. *Ann Rev Biochem* 1975;44:435-51.
30. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.
31. Cantoni GL. S-adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J Biol Chem* 1953;204:403-416.
32. Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, et al. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet* 1997;13:51-52.
33. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 1997;73:265-280.
34. Katz JE, Dlakić M, Clarke S. Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:525-540.
35. Surtees R, Leonard J, Austin S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet* 1991;338:1550-4.

36. Surtees R. Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. *Eur J Pediatr* 1998;157:S118-21.
37. Mudd SH, Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Minniti G, Caruso U, i sur. Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:448-64.
38. Barić I, Fumić K, Glenn B, Ćuk M, Schulze A, Finkelstein JD, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4234-9.
39. Barić I, Ćuk M, Fumić K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inher Metab Dis* 2005;28:885-902.
40. Buist NRM, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, S. Stabler S, Allen RH, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year old man. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:538-45.
41. Ćuk M, Lovrić M, Fumić K, Wagner C, Stabler S, Allen R, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: further evidence of congenital miopathy. *Clin Chem Lab Med* 2007;5:A43.
42. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:705-13.
43. Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Human Mutation* 2009;30:555-65.
44. Barić I, Ćuk M, Petković-Ramadža D, Bilić K, Zibar K, Sarnavka V, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency - a review of nine patients. *Mol Genet Metab* 2012;105:303.
45. Barić I. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis* 2009;28:885-902.
46. Honzik T, Magner M, Krijt J, Sokolová J, Vugrek O, Beluzić R, i sur. Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol Genet Metab* 2012;107:611-3.

47. Barić I, Staufner C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grünert SC, i sur. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:5-20.
48. Frezza M, Surrenti C, Manzillo G, Fiaccadori F, Bortolini M, Di Padova C. Oral S-adenosylmethionine in the symptomatic treatment of intrahepatic cholestasis: a double-blind, placebo controlled study. *Gastroenterol* 1990;99:211-5.
49. Mato JM, Camara J, de Paz JF, Caballería L, Coll S, Caballero A. Adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 1999;30:1081-1089.
50. Santini D, Vincenzi B, Massacesi C, Picardi A, Gentilucci UV, Esposito V, i sur. S-adenosylmethionine (AdoMet) supplementation for treatment of chemotherapy-induced liver injury. *Anticancer Res* 2003;23:5173-9.
51. Vincenzi B, Daniele S, Frezza AM, Berti P, Vespasiani U, Picardi A, i sur. The role of S-adenosylmethionine in preventing oxaliplatin-induced liver toxicity: a retrospective analysis in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab plus oxaliplatin-based regimen. *Support Care Cancer* 2012;20:135-9.
52. Papakostas GI, Cassiello CF, Iovieno N. Folates and S-adenosylmethionine for major depressive disorder. *Can J Psychiatr* 2012;57:406-13.
53. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD, i sur. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1851–1858.
54. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, i sur. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3059–3064.
55. Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:171–174.
56. Quere I, Paul V, Rouillac C, Janbon C, London J, Demaille J, i sur. Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:127–137.

57. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1694–1699.
58. Clarke S, Banfield K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. U: Carmel R, Jacobsen DW, ur. *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, str. 63-78.
59. Hirsch S, Ronco AM, Guerrero-Bosagna C, de la Maza MP, Leiva L, Barrera G, i sur. Methylation status in healthy subjects with normal and high serum folate concentration. *Nutrition* 2008;24:1103-9.
60. Gellekink H, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van Rooij A, Struys EA, den Heijer M, Blom HJ. Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma. *Clin Chem* 2005;51:1487-92.
61. Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Yi P, James SJ. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5-phosphate concentrations. *Clin Chem* 2000;46:265–72.
62. Stabler SP, Allen RH. Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50:365–72.
63. Fux R, Kloor D, Hermes M, Röck T, Proksch B, Grenz A, i sur. Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation potential of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy male volunteers. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:786-92.
64. Greenberg ML, Chaffee S, Hershfield MS. Basis for resistance to 3-deazaazasteromycin, an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, in human lymphocytes. *J Biol Chem* 1989;264:595–603.
65. Scott JM, Mollo AM, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG. Effects of the disruption of transmethylase in the central nervous system: an animal model. *Acta Neurol Scand* 1994;154:27-31.
66. Molloy AM, Orsi B, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG, Scott JM. The relationship between the activity of methionine synthase and the ratio of S-adenosylmethionine to S-

- adenosylhomocysteine in the brain and other tissues of the pig. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1349-1355.
67. Schatz RA, Wilens TE, Sellinger OZ. Decreased transmethylation of biogenic amines after in vivo elevation of brain S-adenosyl-homocysteine. *J Neurochem* 1981;36:1739-48.
 68. Leonard EJ, Skeel A, Chiang PK, Cantoni GL. The action of the adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine, on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84:102-109.
 69. Chiang PK, Im YS, Cantoni GL. Phospholipids biosynthesis by methylations and choline incorporation: effect of 3-deazaadenosine. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;94:174-181.
 70. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 1998;17:3207-3213.
 71. Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther* 1998;77:115-134.
 72. Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* 1991;12:1307-1312.
 73. Pogribny IP, Miller BJ, James SJ. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett* 1997;115:31-38.
 74. Chiang PK. Conversion of 3T3–L1 fibroblasts to fat cells by an inhibitor of methylation: effect of 3-deazaadenosine. *Science* 1981;211:1164-66.
 75. Kredich NM, Hershfield MS. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2450-4.
 76. Wagner C, Koury MJ. S-Adenosylhomocysteine: a better indicator of vascular disease than homocysteine? *Am J Clin Nutr* 2007;86:1581-5.
 77. Herrmann W, Obeid R. Biomarkers of folate and vitamin B₁₂ status in cerebrospinal fluid. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(12):1614-20.
 78. di Padova C. S-adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis. Review of the clinical studies. *Am J Med* 1987;83:60–5.

79. Tavoni A, Vitali C, Bombardieri, Pasero GS. Evaluation of S-adenosylmethionine in primary fibromyalgia. A double-blind crossover study. *Am J Med* 1987;83:107–10.
80. Hao X, Huang Y, Qiu M, Yin C, Ren H, Gan H, i sur. Immunoassay of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine: the methylation index as a biomarker for disease and health status. *BMC Research Notes* 2016;9:498.
81. Hershfield MS, Arredondo-Vega FX, Santisteban I. Clinical expression, genetics and therapy of adenosine deaminase (ADA) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:179-85.
82. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318-23.
83. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:724-31.
84. Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, i sur. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1993;268:11910-16.
85. Hum DW, Bell AW, Rozen R, MacKenzie RE. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *J Biol Chem* 1988;263:15946-50.
86. George L, Mills JL, Johansson ALV, Nordmark A, Olander B, Granath F, i sur. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA* 2002;288:1867-1873.
87. Huhta JC, Hernandez-Robles HA. Homocysteine, folate and congenital heart defects. *Fetal Pediatr Pathol* 2005;24:2,71-79.
88. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-950.
89. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-35.
90. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2007;85:285S-288S.
91. Blom HJ. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Res A: Clin Mol Teratol* 2009;85:295-302.

92. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, i sur. 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004;41:454-58.
93. Moephuli SR, Klein NW, Baldwin MT, Krider HM. Effects of methionine on the cytoplasmic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:543-48.
94. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, i sur. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 1994;43:1475-80.
95. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *PNAS* 1996;93:15227-15232.
96. Ionescu-Ittu R, Marelli AJ, Mackie AS, Pilote I. Prevalence of severe congenital heart disease after folic acid fortification of grain products: time trend analysis in Quebec, Canada. *BMJ* 2009; 338:b1673.
97. Ray JG, HJ Blom. Vitamin B₁₂ insufficiency and the risk of fetal neural tube defects. *Q J Med* 2003;96:289-295.
98. Galić S. Značenje polimorfizma C677T gena za 5,10- metilentetrahidrofolat reduktazu u patogenezi poremećaja neuralne cijevi u populaciji Hrvatske (magistarski rad). Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilista u Zagrebu; 2005.
99. Scanlon KS, Ferencz C, Loffredo CA. Preconceptional folate intake and malformations of the cardiac outflow tract. Baltimore - Washington Infant Study Group. *Epidemiol* 1998;9:95-8.
100. Wenstrom KD, Johannig GL, Johnston KE, DuBard M. Association of the C677T methylene-tetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:806-12.
101. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J of Clin Nutr* 2005;81:147–153.
102. Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Melnyk S, James SJ. Congenital heart defects and maternal biomarkers of oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 2005;82:598–604.

103. Galdieri LA, Arrieta SR, Silva CMC, Pedra CA, D'Almeida V. Homocysteine concentrations and molecular analysis in patients with congenital heart defects. *Arch Med Res* 2007; 38:212-218.
104. Obermann-Borst SA, van Driel LMJW, Helbing WA, de Jonge R, Wildhagen MF, Steegers EAP, i sur. Congenital heart defects and biomarkers of methylation in children: a case - control study. *Europ J Clin Invest* 2011;41:143-150.
105. Alsayed R, Al Quobaili F, Srouf S, Geisel J, Obeid R. Elevated dimethylglycine in blood of children with congenital heart defects and their mothers. *Metabolism* 2013;62:1074-80.
106. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
107. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, i sur. A candidate genetic risk factor for vascular disease. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
108. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, i sur. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
109. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
110. Richardson B. Impact on aging on DNA Methylation. *Ageing Res Rev* 2003;2:245-261.
111. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, i sur. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Eng J Med* 1999;340:9-13.
112. Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, i sur. Methylene-tetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 1999;86:71-4.
113. Hobbs CA, James SJ, Parsian A, Krakowiak PA, Jernigan S, Greenhaw JJ, i sur. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet* 2006;43:162-6.

114. Shaw GM, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs FB, Carmichael SL, i sur. SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Med Genet* 2009;10:49.
115. van Driel LM, Verkleij-Hagoort AC, de Jonge R, Zhao W, MacLeod SL. Two MTHFR polymorphisms, maternal B-vitamin intake, and CHDs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82:474–81.
116. van Beynum IM, den Heijer M, Blom HJ, Kapusta L. The MTHFR 677C->T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis. *QJM* 2007;100:743–53.
117. van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M, Vermeulen SH, Kouwenberg M, Daniëls O, i sur. Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *Eur Heart J* 2006;2:981-7.
118. Hobbs CA, Cleves MA, Karim MA, Zhao W, MacLeod SL, i sur. Maternal folate-related gene environment interactions and congenital heart defects. *Obstet Gynecol* 2010; 116:316-322.
119. Yu ZB, Han SP, Guo XR. A meta-analysis on the risk factors of perinatal congenital heart disease in Chinese people. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2008; 29:1137-40.
120. Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H, Halimeh S, Kosch A, Koch HG, i sur. Infant methylenetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovas Res* 2001;51:251-254.
121. Sánchez-Urbina R, Galaviz-Hernández C, Sierra-Ramírez JA, Rangel-Villalobos H, Torres-Saldúa R, Alva-Espinoza C, i sur. Methylenetetrahydro-folate reductase gene 677CT polymorphism and isolated congenital heart disease in a Mexican population. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012;65:158-63.
122. Zhang Y, He X, Xiong X, Chuan J, Zhong L, Guo Chen G, i sur. The association between maternal methylenetetrahydro-folate reductase C677T and A1298C polymorphism and birth defects and adverse pregnancy outcomes. *Prenat Diagn* 2019;39:3-9.
123. Park EI, Garrow T. Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. *J Biol Chem* 1999;274:7816-7824.

- 124.** Heil SG, Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Trijbels FJ, i sur. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): Genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans. *Mol Genet Metab* 2000;71:511-519.
- 125.** Ananth CV, Elsasser D, Kinzler WL, Peltier MR, Getahun D, Leclerc D, i sur. Polymorphisms in methionine synthase reductase and betaine-homocysteine S-methyltransferase genes: Risk of placental abruption. *Mol Genet Metab* 2007;91:104-110.
- 126.** Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, i sur. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. *Biomed Res Int* 2014;560183.
- 127.** Liu J, Qi J, Yu X, Zhu J, Zhang L, Ning Q, i sur. Investigations of single nucleotide polymorphisms in folate pathway genes in Chinese families with neural tube defects. *J Neurol Sci* 2014;337:61-66.
- 128.** Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, i sur. Neural tube defects and folate pathway genes: Family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect* 2006;114:1547-1552.
- 129.** Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Dziegielewska M, Jagodzinski PP. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet* 2010;47:809-815.
- 130.** Zampieri BL, Biselli BM, Goloni-Bertollo EM, Vannucchi H, Carvalho VM, Cordeiro JA, i sur. Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. *Dis Markers* 2012;32:73-81.
- 131.** Quadros EV. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 2010;148:195-204.
- 132.** Li N, Seetharam S, Lindemans J, Alpers DH, Arwert F, Seetharam B. Isolation and sequence analysis of variant forms of human transcobalamin II. *Biochim Biophys Acta* 1193;1172:21-30.
- 133.** Lievers KJ, Afman LA, Kluijtmans LA, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. *Clin Chem* 2002;48:1383-1389.

134. Namour F, Olivier J, Abdelmoultaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, i sur. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97:1092-1098.
135. Godbole K, Gayathri P, Ghule S, Sasirekha BV, Kanitkar-Damle A, Memane N, i sur. Maternal one-carbon metabolism, MTHFR and TCN2 genotypes and neural tube defects in India. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:848-856.
136. Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 2001;276:35558-35563.
137. Deng L, Elmore CL, Lawrance AK, Matthews RG, Rozen R, i sur. Methionine synthase reductase deficiency results in adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Mol Genet Metab* 2008;94:336-342.
138. Elmore CL, Wu X, Leclerc D, Watson ED, Bottiglieri T, Krupenko NI, i sur. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol Genet Metab* 2007;91:85-97.
139. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, i sur. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-456.
140. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, i sur. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B₁₂) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-323.
141. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, i sur. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:623-630.
142. van Beynum IM, Kouwenberg M, Kapusta L, den Heijer M, van der Linder IJ, Daniels O, i sur. MTRR 66A>G polymorphism in relation to congenital heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1317-23.
143. Zeng W, Liu L, Tong Y, Liu HM, Dai L, Mao M, i sur. A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital heart defects in the Chinese Han population. *Genet Mol Res* 2011;10:2597-2605.

144. Cui XA, Singh B, Park J, Gupta RS. Subcellular localization of adenosine kinase in mammalian cells: the long isoform of AdK is localized in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:46-50.
145. Bjursell M, Blom H, Cayuela JA, Engvall ML, Lesko N, Balasubramaniam S, i sur. Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. *Am J Hum Genet* 2011;89:507–15.
146. Alhusani A, Obaid A, Blom HJ, Wedell A, Alfadhel M. Adenosine Kinase Deficiency: Report and Review. *Neuropediatrics* 2019;50:46-50.
147. Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL, i sur. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 2000;33:101-25.
148. Prigge ST, Chiang PK. S-Adenosylhomocysteine hydrolase. U: Carmel R, Jacobsen DW, ur. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, str. 63-78.
149. Miller MV, Duhl DM, Winkes BM, Arredondo-Vega F, Saxon PJ, Wolff GL, i sur. The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) gene. *EMBO J* 1994;13:1806-16.
150. Rocha PS, Sheikh M, Melchoirre R, Fagard M, Boutet S, Loach R, i sur. The Arabidopsis homology-dependent gene silencing1 gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell* 2005;17:404-17.
151. Mull L, Ebbs ML, Bender J. A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in Arabidopsis S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Genetics* 2006;174:1161-71.
152. Bolander-Gouaile C. How can hyperhomocysteinaemia be harmful? U: Bolander-Gouaile C, ur. *Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism*. Second ed. Pringer Verlage. France: 2002; str. 32-68.
153. Feng Q, Keshtgarpour M, Pelleymounter LL, Moon I, Kalari KR, Eckloff BW, i sur. Human S-adenosylhomocysteine hydrolase: common gene sequence variation and functional genomic characterization. *J Neurochem* 2009;110:1806-17.

154. Bissbort S, Bender K, Wienker TF, Grzeschik KH. Genetics of human S-adenosylhomocystein hydrolase. A new polymorphism in man. *Hum Genet* 1983;65:68-71.
155. Akiyama K, Nakamura S, Abe K. Gene frequencies of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in a Japanese population. *Hum Genet* 1984;68:191-2.
156. Scheil HG, Borner E. S-adenosylhomocystein-hydrolase (EC 3.3.1.1)-phänotypen und genfrequenzen in einer westdeutschen population. *Ärztl Lab* 1985;31:157-8.
157. Corbo RM, Palmarino R, Schiattarella E, Giannini MA, Scacchi R. Polymorphism of S-adenosylhomocysteine hydrolase in Italy. *Hum Hered* 1987;37:186-9.
158. Kloor D, Fumić K, Attig S, Tete M, Osswald H, Barić I, i sur. Studies of S-adenosylhomocysteine hydrolase polymorphism in a Croatian population. *J Hum Genet* 2006;51:21-4.
159. Gellekink H, den Heijer M, Kluijtmans LA, Bloom HJ. Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *Eur J Hum Genet* 2004;12:942-8.
160. Fumić K, Beluzić R, Čuk M, Pavkov T, Kloor D, Barić I, i sur. Functional analysis of human S-adenosylhomocysteine hydrolase isoforms SAHH-2 and SAHH-3. *Eur J Hum Genet* 2007;15:347-51.
161. Feng Q, Pelleymounter LL, Moon I, Kalari KR, Eckloff BW, Wieben ED, i sur. Human S-adenosylhomocysteine hydrolase: common gene sequence variation and functional genomic characterization. *J Neurochem* 2009;110:1806-17.
162. Stender S, Chakrabarti RS, Xing C, Gotway G, Cohen JC, Hobbs HH. Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab* 2015;116:269-74.
163. Strauss KA, Ferreira C, Bottiglieri T, Zhao X, Arning E, Zhang S, i sur. Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab* 2015;116:44-52.
164. Brust P, Johannsen J, Gersting S, Muntau AC, Blom H, Lessel D, i sur. Reverse phenotyping of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency (SAHHD): new cases illustrate phenotypical and clinical variability. 49th European Metabolic Group Conference: Zagreb; 2017, knjiga sažetaka, str. 77-78.

165. Belužić R, Vugrek O. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: a natural model system for methylation research. *Rad Med Sci* 2010;35:77-92.
166. Belužić R, Čuk M, Pavkov T, Barić I, Vugrek O. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AdoHcyase) deficiency: enzymatic capabilities of human AdoHcyase are highly effected by changes to codon 89 and its surrounding residues. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:30-6.
167. Barić I, Stauffer C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grünert SC, Opladen T, i sur. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:5-20.
168. Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, Steegers EA. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Brit J Nutr* 2001;85:49-58.
169. Nurk E, Tell GS, Vollset SE, Nygård O, Refsum H, Nilsen RM, i sur. Changes in lifestyle and plasma total homocysteine: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2004;79:812-819.
170. Bilandžija I, Bogić A, Škaričić A, Križić I, Zekušić M, Fumić K. Određivanje referentnih intervala S-adenozilmetionina (SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH) u plazmi na tandemskom spektrometru masa. Deveti kongres Hrvatskog društva za Medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu s međunarodnim sudjelovanjem: Zagreb; 2018, knjiga sažetaka, str. 44.
171. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
172. Liu CC, Ho WY, Leu KL, Tsai HM, Yang TH. Effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. *J Biochem Mol Toxicol* 2009;23:349-56.
173. Lin PY, Yang TH, Lin HG. Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line. *Clin Chim Acta* 2007;379:139-44.
174. Yang TH, Yang NC, Hu ML. S-adenosylhomocysteine enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage by inhibition of DNA repair in two cell lines. *Nutr Cancer* 2003;47:70-5.

175. Capdevila A, Decha-Umphai W, Song KH, Borchardt RT, Wagner C, i sur. Pancreatic exocrine secretion is blocked by inhibitors of methylation. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:47-55.
176. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nut* 2002;132:2361S-2366S.
177. Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, i sur. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine β -synthase heterozygous mice. *J Nutr* 2001;131:281-2818.
178. Zhang Z, Adelman AS, Rai D, Boettcher J, Lönnerdal B. Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: a systematic review. *Nutrients* 2013;5:4800-4821.
179. Brunton JA, Ball RO, Pencharz PB. Current total parenteral nutrition solutions for the neonate are inadequate. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:299-304.
180. Mudd SH, Braverman N, Pomper M, Tezcan K, Kronick J, Jayakar P, i sur. Infantile hypermethioninemia and hyperhomocysteinemia due to high methionine intake: a diagnostic trap. *Mol Genet Metab* 2003;79:6-16.
181. Yu Y-M, Burke JF, Young VR. A kinetic study of L-2H3-methyl-1-13C methionine in patients with severe burn injury. *J Trauma* 1993;35:1-7.
182. Kalhan SC, Uppal SO, Moorman JL, Bennett C, Gruca LL, Parimi PS, i sur. Metabolic and Genomic Response to Dietary Isocaloric Protein Restriction in the Rat. *J Bio Chem* 2011;286:5266-5277.
183. Semmler A, Smulders Y, Struys E, Smith D, Moskau S, Blom H, i sur. Methionine metabolism in an animal model of sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1398-1402.
184. Chowdhury S, Erickson SW, MacLeod SL, Cleves MA, Hu P, Karim MA, i sur. Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects. *PLoS One* 2011;6:e16506.
185. Roy J, Kazi M, Hedin U, Thyberg J. Phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK1/2. *Differentiation* 2001;67:50-58.
186. Baker JE. Oxidative stress and adaptation of the infant heart to hypoxia and ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:423-429.

187. Abaci N, Arıkan M, Tansel T, Sahin N, Cakiris A, Pacal F, i sur. Mitochondrial mutations in patients with congenital heart defects by next generation sequencing technology. *Cardiol Young* 2015;25:705-711.
188. Haggarty P, Hoad G, Campbell DM, Horgan G W, Piyathilake C, McNeill G. Folate in pregnancy and imprinted gene and repeat element methylation in the offspring. *Am J Clin Nutr* 2013;97:94-99.
189. Tserga A, Binder AM, Michels KB. Impact of folic acid intake during pregnancy on genomic imprinting of *IGF2/H19* and 1-carbon metabolism. *FASEB J* 2017;31:5149-5158.
190. Shinde SB, Save VC, Patil ND, Mishra KP, Tendolkar AG. Impairment of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in tetralogy of Fallot. *Clin Chim Acta* 2007;377:138-43.
191. Maurer I, Zierz S. Mitochondrial respiratory chain enzyme activities in tetralogy of Fallot. *Clin Investig* 1994;72(5):358-63.
192. Zanatta Â, Cecatto C, Ribeiro RT, Amaral AU, Wyse AT, Leipnitz G, i sur. S-adenosylmethionine promotes oxidative stress and decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex supernatants of adolescent rats: implications for the pathogenesis of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Neurobiol* 2018;55:868-878.
193. Barić I, Erdol S, Saglam H, Lovrić M, Belužić R, Vugrek O, i sur. Glycine N-methyltransferase deficiency: a member of dysmethylating liver disorders? *JIMD Rep* 2017;31:101-106.
194. Martínez-Chantar ML, Vázquez-Chantada M, Ariz U, Martínez N, Varela M, Luka Z, i sur. Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2008;47:1191-9.
195. Farrar C, Clarke S. Altered levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the brains of L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem* 2002;277:27856-27863.
196. Imbard A, Blom HJ, Schlemmer D, Barto R, Czerkiewicz I, Rigal O. Methylation metabolites in amniotic fluid depend on gestational age. *Prenat Diagn* 2013;33:848-85.

197. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, i sur. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 1999;69:482-9.
198. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, i sur. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 2006;136:1731-1740.
199. Febriani AD, Sakamoto A, Ono H, Sakura N, Ueda K, Yoshii C, i sur. Determination of total homocysteine in dried blood spots using high performance liquid chromatography for homocystinuria newborn screening. *Pediatr Int* 2004;46:5-9.
200. MacCoss MJ, Fukagawa NK, Matthews DE. Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:947-955.
201. Thomas B, Gruca LL, Bennett C. Metabolism of methionine in the newborn infant: response to the parenteral and enteral administration of nutrients. *Pediatr Res* 2008;64:381-386.
202. Stead LM, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism. *Adv Enzyme Regul* 2004;44:321-333.
203. Prudova A, Bauman Z, Braun A, Vivitsky V, Lu SC, Banerjee R. S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine β -synthase and modulates redox capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6489-6494.
204. Stabler SP, Allen RH. Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50:365-372.
205. Mirecki-Garrido MD, Guerra B, Mateos-Díaz C, Jiménez-Monzón R, Díaz-Chico N, Díaz-Chico JC, i sur. The influence of estrogens on the biological and therapeutic actions of growth hormone in the liver. *Pharmaceuticals* 2012;5:758-778.
206. Sarris J, Price LH, Carpenter LL, Tyrka AR, Ng CH, Papakostas GI, i sur. Is S-adenosylmethionine (SAMe) for depression only effective in males? A re-analysis of data from a randomized clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 2015;48:141-144.
207. Mallamaci F, Zoccali C, Tripepi G, Fermo I, Benedetto FA, Cataliotti A, i sur. Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002;61:609-614.

208. Perna AF, Ingrosso D, Galletti P, Zappia V, De Santo NG. Enzymatic methylesterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure. Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine. *J Clin Invest* 1993;91:2497-2503.
209. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, i sur. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uremia. *Lancet* 2003;361:1693-1699.
210. Perna AF, Ingrosso D, Satta E, Lombardi C, Galletti P, D'Aniello A, i sur. Plasma protein aspartyl damage is increased in hemodialysis patients: studies on causes and consequences. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2747-2754.
211. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;59:536-45.
212. Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Erickson JD. Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: results from a population-based, case-control study. *Pediatrics* 1996;98:911-7.
213. Draušnik Ž. Pobačaji u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2016. godine. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017.
214. Rodin U, Draušnik Ž, Cerovečki I. Porodi u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2017. godine. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017.
215. Draušnik Ž, Rodin U. Pobačaji u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2017. godine. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018.
216. Rodin U, Draušnik Ž, Cerovečki I, Jezdić D. Porodi u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2017. godine. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018.
217. Mascarenhas M, Habeebullah S, Sridhar MG. Revisiting the role of first trimester homocysteine as an index of maternal and fetal outcome. *J Pregnancy* 2014;2014:123024.
218. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK, i sur. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2000;95:519-24.

- 219.** Tang LS, Włodarczyk BJ, Santillano DR, Miranda RC, Finnell RH. Developmental consequences of abnormal folate transport during murine heart morphogenesis. *Birth Defects Res A* 2004;70:449-458.
- 220.** EUROCAT Special Report: Primary Prevention of Congenital Anomalies in European Countries, EUROCAT Central Registry, University of Ulster (Updated version 2013) Dostupno na adresi <http://www.eurocat-network.eu>. Datum pristupa informaciji 01. ožujka 2019.
- 221.** Chivu CM, Brezis M, Tulchinsky TH, Soares-Weiser K, Braunstein R. A systematic review of interventions to increase awareness, knowledge, and folic acid consumption before and during pregnancy. *Am J Health Prom* 2008;22:237-45.
- 222.** Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification - its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients* 2011;3:370–384.
- 223.** Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, i sur. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre to postfortification using assay adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr* 2012;142:886–893.
- 224.** Pickell L, Brown K, Li D, Wang X, Deng L, Wu Q, i sur. High intake of folic acid disrupts embryonic development in mice. *Birth Defects Res A* 2011;91:8-19.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Dorotea Ninković je rođena 24. kolovoza 1976. u Osijeku. Pohađala je Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci koju je završila 1995. godine. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci je diplomirala 2001. godine s odličnim uspjehom. Dobitnica je Dekanove nagrade u više navrata te Rektorove nagrade 2000. godine. Od 2001. do 2004. godine bila je znanstveni novak na Katedri za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Specijalizaciju iz pedijatrije je obavila od 2004. do 2009. godine na Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Od 2009. godine radi kao specijalist pedijatar u Zavodu za neonatologiju i intenzivno liječenje novorođenčadi Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Godine 2014. postaje subspecijalist neonatologije. U suradničkom je zvanju asistenta na Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od siječnja 2017. Predavač je na poslijediplomskom studiju „Pedijatrija“. Kao autor ili suautor je publicirala više znanstvenih i stručnih radova od kojih je 5 indeksirano u bazi *Current Contents*. Objavljeni radovi su citirani 71 put. Uz domaće znanstvene projekte, sudjelovala je na projektima financiranim od strane Europske Unije, i to „Euroglycanet“ (European network focused on congenital disorders of glycosylation) i “InNerMeD-I-Network” (Inherited Neurometabolic Disorder Information Network). Udana je i majka dvoje djece.

PRILOG

Anketni list za istraživanje metilacijskih poremećaja u prirođenim srčanim grešakama

Prezime i ime ispitanika: _____

Prezime i ime majke ispitanika: _____

Datum rođenja ispitanika: _____

Adresa: _____

Broj telefona: _____

Datum uzimanja uzorka ispitanika: _____

Datum uzimanja uzorka majke ispitanika: _____

Kardiološka dijagnoza ispitanika (popunjava kardiolog ili neonatolog):

Osnova dijagnoze (zaokružiti): a) klinički pregled, b) EKG, c) ultrazvuk, d) kateterizacija srca, e) operacijski nalaz

Ostale bolesti i/ili malformacije u djeteta (ako ih ima, molimo navesti) _____

Jeste li Vi, majka djeteta, uzimali 400 mcg folne kiseline svakodnevno 4 tjedna prije začeća i 8 tjedana nakon začeća: da ne

Ako je količina drugačija ili je razdoblje uzimanja drugačije, molim navedite:

Jeste li Vi, majka djeteta, uzimali vitamin B₁₂ svakodnevno 4 tjedna prije začeća i 8 tjedana nakon začeća: da ne

Ako da, u kojoj dozi :

Je ste li Vi, majka djeteta, uzimali 400 mcg folne kiseline trenutku uzimanja uzorka krvi Vašeg djeteta: da ne

Ako je količina drugačija, molim navedite:

Jeste li Vi, majka djeteta, uzimali vitamin B₁₂ u trenutku uzimanja uzorka krvi Vašeg djeteta: da ne

Ako da, u kojoj dozi :

Je ste li Vi, majka djeteta, uzimali 400 mcg folne kiseline
u trenutku uzimanja uzorka Vaše krvi :

da ne

Ako je količina drugačija, molim navedite:

Jeste li Vi, majka djeteta, uzimali vitamin B₁₂ u trenutku uzimanja uzorka Vaše krvi:

da ne

Ako da, u kojoj dozi:

Jeste li u trenutku uzimanja uzorka Vaše krvi trudni:

da ne

Ispunio:

Datum i mjesto: