

# Polimorfizmi gena HOXA1, FOXF1, OSR1 i MTRR kao čimbenici rizika prirođenih malformacija

---

**Lozić, Bernarda**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:363612>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-31**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**BERNARDA LOZIĆ**

**POLIMORFIZMI GENA *HOXA1*, *FOXF1*, *OSR1* i *MTRR* KAO  
ČIMBENICI RIZIKA PRIROĐENIH MALFORMACIJA**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2014.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**BERNARDA LOZIĆ**

**POLIMORFIZMI GENA *HOXA1*, *FOXF1*, *OSR1* i *MTRR* KAO  
ČIMBENICI RIZIKA PRIROĐENIH MALFORMACIJA**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2014.**

**Ovaj rad je izrađen pri:**

- **Katedri za medicinsku biologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu**
- **Kliničkom zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split**
- **Klinici za dječje bolesti KBC-a Split**

**Voditelji rada:**        **prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj**  
                                 **prof. dr. sc. Tatijana Zemunik**

*Zahvaljujem* dragim mentorima na idejama i sugestijama te pomoći, potpori i korisnim savjetima tijekom izrade ove disertacije.

*Zahvaljujem* svim kolegicama, kolegama i medicinskim sestrama Klinike za dječje bolesti i Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, a posebno veliko hvala **prof. dr. sc. Ivani Kuzmić Prusac** na korisnim savjetima pri prikupljanu i selekciji uzoraka.

*Zahvaljujem* članovima povjerenstva - doc. dr. sc. **Vesni Boraska Perici**, prof. dr. sc. **Floriani Bulić-Jakuš** i prof. dr. sc. **Damiru Roje** na vrijednim savjetima i pažljivom čitanju ovog rada.

**Veliku zahvalnost upućujem mojoj obitelji na strpljenju i ljubavi.**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Prirodene anomalije</b> .....	1
1.1.1. Etiologija, patogeneza i klasifikacija prirodnih anomalija.....	1
1.1.2. Klasifikacija prirodnih anomalija prema kliničko etiološkim karakteristikama .....	3
1.1.3. Genetički čimbenici u patogenezi prirodnih malformacija .....	4
1.1.4. Kontrola transkripcije i ekspresije gena.....	5
<b>1.2. Uloga gena uključenih u razvoj u patogenezi prirodnih malformacija</b> .....	6
1.2.1. Gen <i>HOXA1</i> i polimorfizam gena <i>HOXA1</i> : rs10951154 .....	7
1.2.2. Gen <i>OSR1</i> i polimorfizam gena <i>OSR1</i> : rs12329305 .....	10
1.2.3. Gen <i>FOXF1</i> i polimorfizam u blizini gena <i>FOXF1</i> : rs9936833 .....	12
1.2.4. Gen <i>MTRR</i> i polimorfizam gena <i>MTRR</i> : rs326119.....	13
<b>1.3. Genetički pristup u istraživanju etiologije složenog fenotipa</b> .....	17
1.3.1. Pregled dosadašnjih istraživanja gena uključenih u embrijski razvoj čovjeka .....	21
1.3.2. Kriteriji odabira kandidatnih polimorfizama u našoj studiji.....	22
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI</b> .....	24
<b>2.1. Hipoteza</b> .....	24
<b>2.2. Ciljevi</b> .....	25
<b>3. ISPITANICI I METODE RADA</b> .....	26
<b>3.1. Ustroj istraživanja</b> .....	26
<b>3.2. Etička načela</b> .....	26
<b>3.3. Ispitanici</b> .....	26
3.3.1. Kriterij odabira ispitanika i razvrstavanje u skupine .....	26
3.3.2. Snaga istraživanja .....	28
<b>3.4. Metode</b> .....	29
3.4.1. Genotipizacija uzoraka.....	29
3.4.2. Izolacija DNA .....	29
3.4.3. Genotipizacija četiri polimorfizma pomoću <i>real-time</i> PCR metoda .....	30
3.4.4. Statistički postupci .....	31
3.4.4.1. Analiza kvalitete .....	31
3.4.4.2. Analiza povezanosti.....	33

<b>4. REZULTATI</b> .....	35
<b>5. RASPRAVA</b> .....	48
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	57
<b>7. SAŽETAK</b> .....	58
<b>8. SUMMARY</b> .....	59
<b>9. LITERATURA</b> .....	60
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	69

## Popis kratica

ACD/MPV – alveolo kapilarna displazija s nepravilnim utokom pulmonalnih vena (engl. *Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of Pulmonary Veins*)

AMS – anomalija mokraćnog sustava

*BMP4* – gen za koštani morfogeni protein 4 ( engl. *Bone Morphogenetic Proteins 4*)

CEU – srednjoeuropska (engl. *Central European*)

CD-CV – učestala bolest – učestala varijanta (engl. *Common disease –Common variant*)

CEBP $\alpha$  – vežući protein pojačivač alfa (engl. *CCAAT/Enhancer Binding Protein, alpha* )

DSV – DNA sekvencijska varijanta (engl. *DNA sequence variant*)

*ERBB4* – gen virusni homolog onkogeno ptičije eritroblastične leukemije (engl. *v-erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 4*)

FFPE – formalinom fiksirano u parafin uklopljeno (engl. *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*)

*Fgfr3* – gena za receptor fibroblasnog faktora rasta 3 (engl. *Fibroblast growth factor receptor 3*)

*Foxd3* – gen *Foxd3* (engl. *Forkhead box D3*)

*FOXE1* – gen *FOXE1* (engl. *Forkhead Box E1*)

*FOXF1* – gen *FOXF1* (engl. *Forkhead Box F1*)

FOXP2 – protein FOXP2 (engl. *Forkhead Box Protein P2*)

GWAS – cijelogenomska asocijacijska studija (engl. *Genome-Wide Association Study*)

HW – Hardy-Weinberg

*HNF1 $\beta$*  – gen za hepatocitni nuklearni faktor 1 $\beta$  (engl. *Hepatocyte Nuclear Factor1  $\beta$* )

*Hnf1b* – gen *Hnf1b* (engl. *HNF1 homeobox B*)

*HOXA1* – gen *HOXA1* (engl. *Homeo Box A* )

Hyc – homocistein (engl. *Homocysteinaemia*)

*Ikzf 1*– gen *Ikzf 1* (engl. *IKAROS family zinc finger 1, Ikzf1*)

*LEFTY2* – gen faktora 2 za determinacije lijevo-desne osovine (engl. *Left-Right Determination Factor 2*)

*Lhx5* – gen *Lhx5* (engl. *LIM homeobox protein 5*)

MAF – učestalost rjeđeg alela (engl. *Minor Allele Frequency*)

MTR – enzim metionin sintetaza (engl. *Methionine Synthase*)

*MTRR* – gen za enzim metionin sintetazu reduktazu (engl. *Methionine Synthase Reductase*)

*MTHFR* – gen za enzim metilenetetrahidrofolat reduktazu (engl. *Methylenetetrahydrofolate Reductase*)

NCBI dbSNP – (engl. *National Center for Biotechnology Information SNP database*)

nsSNP – ne-sinonimni SNP (engl. *non-synonymous*)

*OSR1* – gen *OSR1* (engl. *Odd-Skipped Related 1*)

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

PA – prirođena anomalija

*PAX2* – gen *PAX2* (engl. *Paired Box 2*)

*Pax8* – gen *Pax8* (engl. *Paired Box 8*)

PD – porođajna duljina

PM – prirođena malformacija

PSG – prirođena srčana greška

PT – porođajna težina

*Runx2* – gen *Runx2* (engl. *Runt related transcription factor 2*)

RV-CD – rijetka varijanta – učestala bolest (engl. *Rare Variant – Common Disease*)

SNP – polimorfizam u jednom nukleotidu (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

sSNP – sinonimni SNP (engl. *synonymous*)

TF – transkripcijski faktor

TSS – transkripcijsko startno mjesto

VATER – vertebralne, analne, traheozofagusne, renalne

*Zic1* – gen *Zic1* (engl. *Zinc finger protein of the cerebellum 1*)



# 1. UVOD

## 1.1. Prirođene anomalije

Razvoj čovjeka iznimno je složen proces koji obuhvaća rast i diferencijaciju u prenatalnom i postnatalnom razdoblju, a bilo kakvo odstupanje od normalnog razvojnog procesa rezultira nastankom razvojnih anomalija. S obzirom na razdoblje kliničke ekspresije, razvojne anomalije mogu se podijeliti na prenatalne i postnatalne (1). Anomalije koje se očituju prenatalno, prilikom rođenja, ili se otkrivaju tijekom prvih mjeseci života nazivaju se prirođenim anomalijama (PA). Definiiraju se kao složena i heterogena skupina poremećaja u embrijskom i/ili fetalnom razvoju čovjeka (2). PA obuhvaćaju tri velike skupine poremećaja, uključujući prirodene strukturne, prirodene metaboličke i ostale genetske poremećaje (3).

Temeljem podataka Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) PA pojavljuju se u svim rasama, kulturama i socioekonomskim klasama s incidencijama od 3-5% u novorođenčadi, dok među mrtvorodenima incidencija raste na 20% (2,4,5). Incidencija PA je veća u multiplim trudnoćama i ima tendenciju rasta, a istraživanja u blizanačkim trudnoćama pokazala su da monozigotni blizanci imaju 2 puta više PA od dizogotnih (6-8). Incidencija PA veća je u muškog spola, a u blizanačkim trudnoćama s djecom različitog spola PA se oko 30% češće pojavljuju u djece muškog spola nego u njihovih blizanačkih sestara (7,8). Epidemiološka istraživanja pokazala su da rasna i etnička pripadnost utječu na razlike u učestalost PA, a objašnjenje za to nije nađeno. PA su učestalije u populaciji crne rase i u Latinoamerikanca u odnosu na pripadnike bijele rase (9).

### 1.1.1. Etiologija, patogeneza i klasifikacija prirodnih anomalija

Općenito se prirodene strukturne anomalije prema kliničkom nalazu dijele na izolirane, koje zahvaćaju jedno područje i multiple, koje zahvaćaju više tjelesnih područja (3). Za većinu izoliranih anomalija specifična etiologija nije poznata i smatra se da one nastaju zbog multifaktorijskih čimbenika, što podrazumijeva da su posljedica interakcije genetičkih čimbenika i čimbenika okoliša (2). Za razliku od izoliranih anomalija, multiple anomalije obično imaju zajednički uzrok i zahvaćaju različita nepovezana anatomska područja (3).

Prema kliničkom značaju prirođene strukturne anomalije dijele se na velike (*major*) i male (*minor*) (3).

Major anomalije su one anomalije koje uzrokuju velike disfunkcije ili su pak nespojive sa životom (uzrokuju smrt ploda ili dojenčeta u više od 50% slučajeva). Većina major PA nastaje u razdoblju od 4. do 8. tjedna trudnoće kada se odvija najintenzivnija organogeneza.

Minor anomalije nemaju većeg kliničkog značenja (osim estetskog), no imaju iznimnu dijagnostičku vrijednost. Multiple anomalije čini kombinacija više *major* i *minor* anomalija (3).

Od svih perinatalno umrlih, a uključuje sve mrtvorodne nakon 28. tjedna trudnoće, kao i umrle u prvom tjednu života, 25-30% su posljedica teških strukturnih prirođenih anomalija različitih organa (10). Djeca s PA imaju veću vjerojatnost da se prijevremeno rode (nedonoščad) i veću vjerojatnost niske porođajne težine (nedostaščad) što čine dodatne čimbenike rizika za perinatalnu smrt (11,12). Specifičnost PA osim što se povezuje s povećanim perinatalnim morbiditetom i mortalitetom, povezuje se i s prijevremeno rođenom djecom (12).

Perinatalna obdukcija često otkriva različite vrste PA koje uključuju jedan (izolirane) ili više organskih sustava (multiple razvojne anomalije). Obje mogu imati genetsku i negenetsku osnovu. Jedan od genetskih uzroka prepoznatljivih prirođenih malformacija, naročito u djece umrle u fetalnom i neonatalnom razdoblju, jesu kromosomske aberacije. Incidencija kromosomskih aberacija u perinatalno umrlih pri slučajnom odabiru ispitanika je od 6-12%, a rezultati su dobiveni klasičnom citogenetikom, odnosno određivanjem kariotipa (13-15). Incidencija kromosomskih aberacija u selektivnoj skupini fetusa s morfološkim anomalijama iznosi 38% (16).

Poznato je da ista anomalija u različitim osoba može imati različitu patogenezu. Prema patogenezi nastanka PA mogu se podijeliti na malformacije, disrupcije, deformacije i poremećaje displazije (2). U kliničkoj stvarnosti često postoje preklapanja između različitih vrsta prirođenih anomalija. Klasifikacija PA nije sveobuhvatna stoga su donesene specifične definicije koje kombiniraju kliničku i etiološku klasifikaciju (2).

### 1.1.2. Klasifikacija prirođenih anomalija prema kliničko etiološkim karakteristikama

**Malformacija** je primarni strukturni defekt organa ili dijela organa, a posljedica je specifične promjene u genetskom materijalu ploda, što daje naslutiti da je razvoj određenog organa bio zaustavljen ili krivo usmjeren. Definiira se kao rani poremećaj embriogeneze (morfogeneze). Većina malformacija koja uključuje jedan organ ima multifaktorsku etiologiju dok su multiple malformacije češće uzrokovane kromosomskim aberacijama, ali mogu nastati i zbog mutacija u jednom genu. Većina malformacija pripada anomalijama razvojnih polja. Razvojno polje je područje ili dio embrija koje pripada funkcionalno integriranoj jedinici i interakciji između različitih procesa tijekom embriogeneze. Malformacije zato često zahvaćaju mnoge različite anatomske strukture (2).

**Disrupcija** je abnormalan strukturni defekt organa ili tkiva, a nastaje kao rezultat vanjskih čimbenika (ishemije, infekcije i ozljede) koji remete normalan razvojni proces. Za razliku od malformacije, razvojni potencijal zahvaćenog organa je normalan. Iako disrupcija ne nastaje zbog promjena u genetskom materijalu ploda, genetička predispozicija može utjecati na nastanak pojedine disrupcije (primjerice, uzimanje folne kiseline prevenira nastanak poremećaja zatvaranja neuralne cijevi i rascjepa nepca samo u nekih žena). Isto tako, pojedini vanjski čimbenici djeluju izravno na DNA molekulu i time mijenjaju genetski materijal ploda (2).

**Deformacija** je anomalija oblika, smještaja ili strukture dijela tijela koja nastaje djelovanjem vanjskih ili unutarnjih mehaničkih sila na prethodno normalno oblikovan dio tijela. Deformacije najčešće zahvaćaju mišićno-koštani sustav i ovisno o težini deformacije postnatalno mogu biti reverzibilne (2).

**Displazija** je abnormalna organizacija stanica u tkivu, većinom je uzrokovana mutacijama u jednom genu, a posljedice su vidljive gdje god je prisutno tkivo pogođeno specifičnom mutacijom pa mogu biti lokalizirane i generalizirane. Displazije mogu biti genetičke etiologije (npr. skeletne displazije) ili mogu nastati zbog moguće disrupcije. Mogu uključivati strukture jednog zametnog listića (ektodermalna displazija) ili više zametnih listića (neurofibromatoza) (1,2).

**Sekvencija** je obrazac multiplih anomalija koja nastaje kao posljedica inicijalne primarne anomalije koja uzrokuje nastanak sekundarnih i tercijarnih pogrešaka u morfogenezi kroz kaskadu zbivanja. U Potterovoj sekvenciji plod stvara manje mokraćne, posljedično uzrokuje oligohidroamnion što rezultira spljoštenim crtama lica, iščašenjem kukova, uvrtnjem stopala i hipoplazijom pluća te često i smrću u neonatalnoj dobi (2).

**Asocijacija** je skupina PA koja nije povezana niti etiologijom niti patogeneom nego pokazuje sklonost češćem pojavljivanju nego bi se moglo očekivati temeljem obične slučajnosti. Glavna razlika u odnosu na sindrom jest izostanak dosljednog pojavljivanja anomalija u zahvaćenih osoba i nedostatak zadovoljavajućeg objašnjenja osnovnog uzroka. Nazive asocijacija često označavaju akronimi (npr. VATER asocijacija označuje vertebralne, **analne**, **traheozofagusne** i **renalne** anomalije). Asocijacije obično nose mali rizik za ponavljanje i etiološki su vjerojatno heterogene. Za neke asocijacije kao što je npr. VATER asocijacija vjeruje se da su genetski uvjetovane (2).

**Sindrom** se definira kao klinički prepoznatljiv model više anomalija za koje znamo uzrok i varijabilnosti u njihovoj prezentaciji. Broj definiranih kromosomskih sindroma raste, a kliničko znanje o pojedinom sindromu je nedostavno zbog malog broja bolesnika. Mnoge anomalije nemaju klinički prepoznatljiv fenotip sindroma (17).

### 1.1.3. Genetički čimbenici u patogenezi prirodnih malformacija

Genetički čimbenici koji reguliraju temeljne embriološke procese poput indukcije, segmentacije, migracije, diferencijacije i apoptoze nisu potpuno istraženi (18). Razvoj molekularne biologije doveo je do otkrića visoko očuvanih obitelji razvojnih gena koji imaju ključnu ulogu u ranoj embriogenezi. Obitelji razvojnih gena identificirane u kralježaka, obično pokazuju veliku homolognost sekvencije s genima koji reguliraju razvoj u vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) (2). Proučavanja na ljudima otkrila su da mutacije različitih članova tih genskih obitelji mogu rezultirati ili izoliranim ili multiplim PA. Neki od tih gena su regulatori jer kodiraju transkripcijske čimbenike ili komponente signalnih puteva dok drugi geni koji također imaju važnu ulogu u razvoju kodiraju strukturne komponente stanica ili ekstracelularnog matriksa i metaboličke enzime, a njihove mutacije otkrivaju važne fenotipove morfoloških anomalija (18).

Mnogi geni uključeni u razvoj kodiraju proteine nazvane transkripcijskim čimbenicima, a oni kontroliraju proces transkripcije RNA s kalupa DNA vežući se za specifične regulatorne sekvencije na DNA i tako stvaraju kompleks koji započinje transkripciju RNA polimerazom. Oni mogu uključiti ili isključiti gene aktivirajući ili suprimirajući njihovu ekspresiju. Također kontroliraju i mnoge druge gene koordiniranom kaskadnom reakcijom, uključujući i mehanizme povratne sprege, regulirajući tako temeljne embriološke procese. Vjeruje se da su ovi procesi posredovani čimbenicima rasta, staničnim receptorima i molekulama poznatim kao morfogeni. Signalne molekule vrlo su slične među

različitim vrstama. Uz to, jasno je da se u svakom organizmu isti molekularni signalni putevi rabe više puta u različitim područjima razvoja. Također je postalo jasno da su ti signalni putevi blisko povezani jedan s drugim, s mnogo „međusobnih razgovora“- u različitim razvojnim poljima (2).

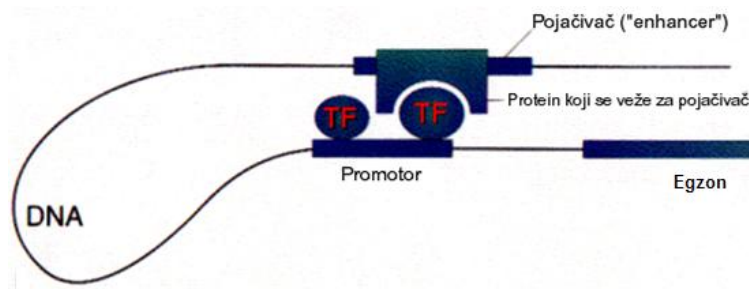
#### 1.1.4. Kontrola transkripcije i ekspresije gena

Regulacija genske ekspresije tijekom humane embriogeneze kontrolirana je između ostalog transkripcijskim čimbenicima koji direktno utječu na ekspresiju gena, stoga su predstavljali interes za ovu doktorsku disertaciju (18).

**Transkripcijski čimbenici** su regulatorni proteini koji su uključeni u regulaciju genske ekspresije. Imaju transkripcijsku aktivnu domenu i DNA-vežuću domenu. DNA-vežućom domenom vežu se za kratke nukleotidne sljedove na DNA molekuli, a posredovanjem proteinskih motiva uzvojnice. Razlikuju se četiri tipa DNA-vežuće domene, a najčešća je uzvojnica-okret-uzvojnica, građena od dviju  $\alpha$ -uzvojnica povezanih kratkim lancem aminokiselina koji čini „okret“. Preostala tri tipa DNA-vežućih domena su cinkovi prsti, leucinski zatvarač, ili uzvojnica – omča - uzvojnica motivi, nazvani zbog svoje specifične strukture (2).

Transkripcijskom aktivnom domenom kontroliraju transkripciju RNA s kalupa DNA i tako stvaraju komplekse koji započinju transkripciju s RNA polimerazom. Dakle, sinteza mRNA započinje s RNA polimerazom koja djeluje zajedno s brojnim proteinima (transkripcijski čimbenici) na promotoru. Polimeraza i transkripcijski čimbenici vežu se za kratke sekvencije DNA unutar promotora. U eukariota se dodatni transkripcijski čimbenici koji pojačavaju transkripciju vežu selektivno i na druge regulatorne sekvencije DNA kao što su GC i CAAT-slogovi, poznati kao pojačivači (engl. *enhancers*). Postoje i negativni regulatori transkripcije ili utišivači (engl. *silencers*) na koje se vežu represori i inhibiraju transkripciju (2). Represori su proteini koji se vežu na DNA sekvenciju i vrše inhibiciju transkripcije.

Transkripcijski čimbenici, poznati kao aktivatori, vežu se na pojačivač, područja DNA koja se nalazi i tisuće parova baza daleko od gena koje kontroliraju (slika 1).



**Slika 1.** Regulacija transkripcije odvija se uz pomoć transkripcijskih čimbenika i pojačivačkih regija na DNA. TF- transkripcijski faktor. (Preuzeto iz genetičke baze podataka: Gene Regulation in Eukaryotes; dostupno na:

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Promoter.html>)

Vežanje povećava brzinu transkripcije gena. Pojačivači mogu biti smješteni uzvodno, nizvodno, ili čak i unutar gena koji kontroliraju. Postoje tisuće pojačivača u genomu, a djelovanje im ovisi o vrsti stanice i signalima koje primaju.

### ***Posttranskripcijska kontrola ekspresije gena***

Regulacija ekspresije većine gena zbiva se za vrijeme transkripcije, ali također može biti na razini doradbe RNA, prijenosa RNA, translacije i stabilnosti mRNA (degradacija mRNA). Životni vijek mRNA molekule u citoplazmi je također važan čimbenik kontrole proteinske sinteze (2).

## **1.2. Uloga gena uključenih u razvoj u patogenezi prirodnih malformacija**

Slabo je poznata patogeneza abnormalnog razvoja pojedinog organa tijekom embrijskog razvoja čovjeka. Nije poznato je li složeni klinički fenotip u bolesnika s kromosomskim aberacijama nastao zbog neravnoteže normalne doze gena bilo većeg broja kopija cijelih kromosoma ili njegovih manjih dijelova, ili je rezultat razvojne nestabilnosti uzrokovane velikim brojem abnormalnih produkata razvojnih gena (19). Tako npr. trisomija 21 kromosoma u sindromu Down nije dovoljna za nastanak najčešće prirodne malformacije, prirodne srčane greške (PSG) (20). Dodatne nepoznate varijante u ostatku genoma i/ili čimbenici okoliša vjerojatno doprinose riziku nastanka PSG-a u sindromu Down (21-24). Nekoliko je velikih studija nedavno dalo novi uvid kako geni uključeni u razvoj sudjeluju u

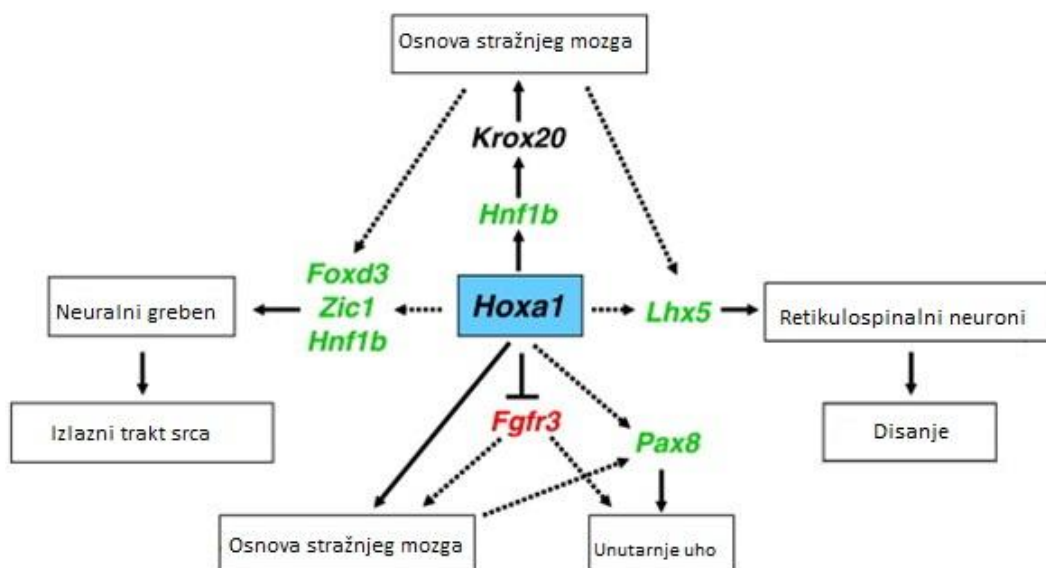
pojedinih fazama razvoja srca i bubrega (25,26). Gen za hepatocitni nuklearni čimbenik 1 $\beta$  (engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 1  $\beta$  - HNF1 $\beta$* ) ključan je u razvoju bubrega. Pretpostavlja se da dodatne genetičke mutacije imaju ulogu u pojačavanju fenotipskih varijabilnosti i da modificiraju efekt mutacija specifičnih gena uključenih u razvoj bubrega te zbog toga imaju važnu ulogu u patogenezi anomalija mokraćnog sustava (AMS). Obiteljske studije provedene u istraživanju AMS-a otkrile su točkaste mutacija u više različitih gena uključenih u razvoj u jedne osobe koje doprinose povećanom riziku ponavljanja anomalije unutar obitelji (25).

Humane genske studije identificirale su brojne gene koji su odgovorni za nasljednu i sporadičnu formu PSG-a, ali patogenetski mehanizmi su još uvijek nepoznati. Mnoge od njih kodiraju transkripcijske čimbenike koji reguliraju specifičnu fazu u razvoju srca, kao što je septacija ventrikula ili morfogeneza izlaznog trakta srca pa polimorfizmi ovih gena doprinose razvoju PSG-a (26).

### **1.2.1. Gen *HOXA1* i polimorfizam gena *HOXA1*: rs10951154**

Čovjek ima 39 homeotičkih gena (engl. *Homeo Box, HOX*) raspoređenih u četiri skupine A, B, C, i D. Svaka skupina sadržava niz blisko vezanih gena. U svakoj skupini *HOX*-a postoji izravna linearna korelacija između položaja gena i njegove vremenske i prostorne ekspresije. Ova zapažanja upućuju na to da ti geni imaju ključnu ulogu u ranoj morfogenezi. Proteini kodirani genima *HOX*-a važni su transkripcijski čimbenici koji aktiviraju ili suprimiraju čitave baterije nizvodnih gena (2).

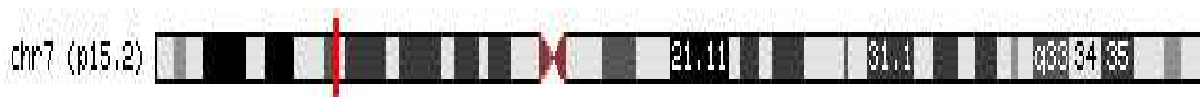
Gen *HOXA1* (engl. *Homeo Box A1*) je visoko konzerviran, pokazuje veliku homolognost sekvence s genom *Hoxa1* kod miša koji se prvi eksprimira i pokreće kaskadu regulacije ekspresije gena tijekom embrijskog razvoja od sljedećih gena: *Foxd3* (engl. *Forkhead box D3*), *Lhx5* (engl. *LIM homeobox protein 5*), *Hnf1b* (engl. *Hnf1 homeobox B*), *Zic1* (engl. *Zinc finger protein of the cerebellum 1*), *Pax8* (engl. *Paired box 8*) i gena za receptor fibroblasnog faktora rasta 3 (engl. *Fibroblast growth factor receptor 3, Fgfr3*), a svi su oni odgovorni za razvoj rhombomere (slika 2) (27).



**Slika 2.** Kaskada regulacije gena *HoxA1*. U sredini dijagrama je gen *HoxA1*, a geni na čiju regulaciju utječe prikazani su u crvenoj i zelenoj boji. Divergirajuće strelice u sredini od gena *HoxA1* pokazuju anatomiska područja koja su regulirana tijekom embrjskog razvoja miša. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 27.)

Gen *HOXA1* je dio A skupine, lociran na kromosomu 7p15.3. Grafički prikaz smještaja gena na kromosomu 7 može se vidjeti na slici 3. Sastoji se od 2 egzona i kodira DNA-vežući čimbenik koji je uključen u regulaciju genske ekspresije i tako utječe na morfogenezu i diferencijaciju (28). Ima važnu ulogu u pravilnom razvoju moždanog debla, unutarnjeg uha i srca u čovjeka i miša (27).



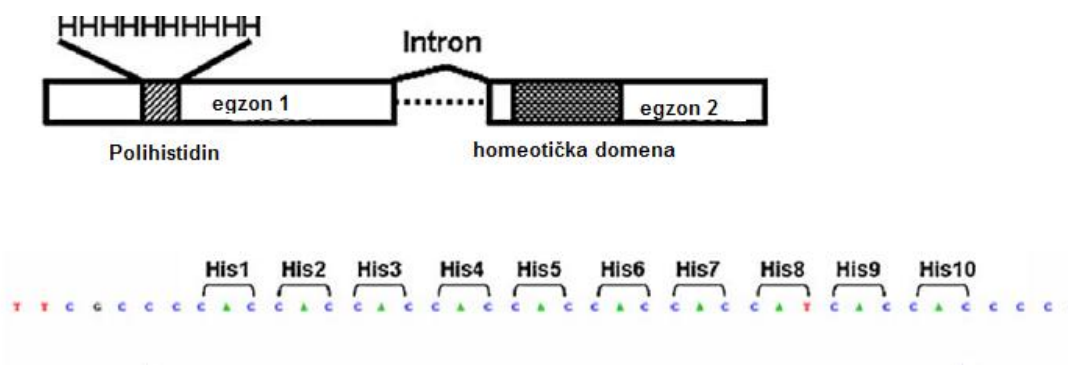


**Slika 3.** Smještaj gena *HOXA1* na kromosomu 7. (Preuzeto iz genomske baze podataka: UCSC; dostupno na: <http://genome.ucsc.edu/>)

Homozigotne mutacije gena *HOXA1* pronađene su u rijetkom recesivnom naslijeđenom sindromu Bosley-Salih-Alorainy čije su značajke: anomalije središnjeg živčanog sustava (SŽS), gluhoća, kardiovaskularne i laringotrahealne anomalije (29,30). Najviše istraživani polimorfizam ovog gena, rs10951154, nalazi se u kodirajućem području gena *HOXA1* u egzonu 1, na 218 nukleotidnom mjestu, a nastao je zbog supstitucija nukleotida A s G pa se označava i kao A218G. Ovaj polimorfizam posljedično uzrokuje promjenu aminokiseline histidina (H) u arginin (R) na 73 poziciji u proteinu (H73R) i tako remeti seriju (niz) od 10 histidinskih ponavljanja koja su evolucijski očuvana u proteinu (slika 4). Pretpostavlja se da prekid histidinskog niza s argininom na 73 mjestu modulira protein-protein interakciju iako za to ne postoje čvrsti dokazi (31).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je polimorfizam gena *HOXA1* (A218G, rs10951154) povezan s kliničkim spektrom autističkih poremećaja i razvojem moždanog debla (31). Concatori i sur. u svojoj su studiji pokazali da ovaj polimorfizam modulira opseg glave u djece sa spektrom autističkih poremećaja (32). Nasuprot tomu Muscarella i sur. u svojoj studiji pokazuju nedostatak povezanosti između polimorfizma A218G i opsega glave u zdravih odraslih osoba, ali ukazuju da se odnos između ovog polimorfizma i anatomije mozga može promijeniti tijekom razvoja (33). Tu hipotezu podupiru nedavna istraživanja o ekspresiji gena *HOXA1* u tkivu mozga koja se dramatično razlikuju ovisno o starosnoj dobi (34). U svojoj studiji Raznahan i sur. varijantu A218G povezuju s razvojem cerebelarnog sustava, a koji je upleten u neurobiologiju spektra autističkog poremećaja (35). Utvrđeno je da se gen *HOXA1* prvi eksprimira u atriju i izlaznom traktu srca za vrijeme embrijskog razvoja pa se pretpostavlja da je potencijalno povezan s razvojem srca i to posebno ventrikularnog septuma (27). U istraživanju Liu i sur. u bolesnika s ventrikularnim septalnim defektom (VSD), nakon što je provedeno sekvenciranje gena *HOXA1* nisu pronađene potencijalno patogene mutacije u

genu *HOXA1* koje bi se povezale s razvojnom anomalijom ventrikularnog septuma. U istom istraživanju pronađene su varijante u kodirajućoj sekvenciji gena za *HOXA1* (egzonu 1), koje ometaju seriju od 10 histidinskih ponavljanja na pozicijama proteinskog proizvoda od 65 do 74 aminokiseline, ali statistički neznačajne (36).



**Slika 4.** Shematski prikaz humanog gena *HOXA1* i položaja polihistidina u HOXA1 proteinu. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 36.)

### 1.2.2. Gen *OSR1* i polimorfizam gena *OSR1*: rs12329305

Gen *OSR1* (engl. *Odd-Skipped Related 1*) lociran je na 2p24.1 kromosomu, ima 3 egzona i kodira protein sa 266 aminokiselina koji ima ulogu transkripcijskog čimbenika. Grafički prikaz drugog kromosoma s označenom lokacijom gena *OSR1* može se vidjeti na slici 5.



**Slika 5.** Smještaj gena *OSR1* na kromosomu 2. (Preuzeto iz genomske baze podataka: UCSC; dostupno na: <http://genome.ucsc.edu/>)

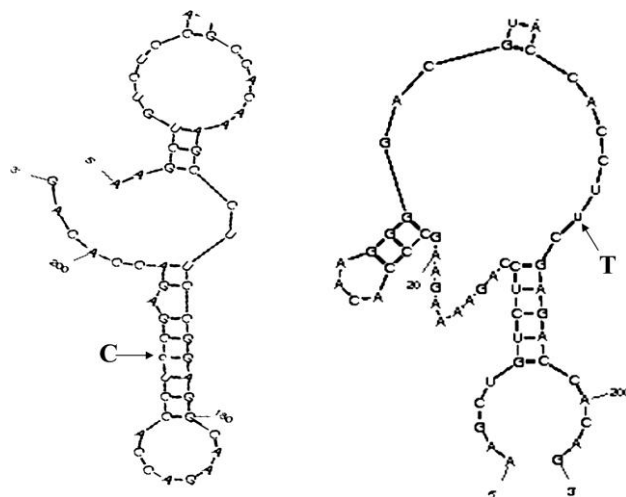
Rani embrijski razvoj srca i bubrega ovisi o ekspresiji *Osr1* u miševa, a homozigotne mutacije ovog gena uzrokuju letalne malformacije bubrega i srca na mišjem modelu (38). Mutacije gena *OSR1* nisu do sada povezane s poznatim kliničkim fenotipom u čovjeka. Glasnička ili mRNA gena *OSR1* je pronađena u tkivu fetalnih pluća i u tkivu odraslih ljudi i to u prostati, testisima debelom i tankom crijevu (37).

OSR1 protein ima važnu ulogu u formiranju i diferencijaciji prekursorskih stanica bubrega, regulira njihovu diferencijaciju u tubularno tkivo i potreban je da ograniči diferencijaciju mezoderma u endoderm (39,40).

*Osr1* je transkripcijski čimbenik s 3 cinkova prstena, a njegova ekspresija u miša regulirana je s glavnim genima odgovornim za hematopoezu genom *Runx2* (engl. *Runt related transcription factor 2*) i genom *Ikzf1* (engl. *IKAROS family zinc finger 1*) odgovornim za osteogenezu (41).

Gen *OSR1* je evolucijski očuvan pa se pretpostavlja da je ključan za nefrogenezu u ljudi kao što je to i u miševa (38).

Polimorfizam rs12329305 u genu *OSR1* utječe na morfogenezu i funkciju bubrega. Na molekularnoj razini polimorfizam rs12329305 humanog gena *OSR1*, nalazi se u kodirajućem području gena (egzon 2), a nastao je zbog supstitucija nukleotida C s T. Do sada je opisan posljedični fenotip ove varijante samo na heterozigotima (CT). Dokazano je da ovaj polimorfizam ometa remodeliranje mRNA gena *OSR1* i uzrokuje smanjenu stabilnost njene tercijarne strukture (slika 6) (42). Posljedično tomu smanjena je stabilnost proteina i bitno promijenjena njegova tercijarna struktura stoga ima utjecaj na morfogenezu i funkciju bubrega. Istraživanje Zhanga i sur. pokazalo je da doprinosi prirođenim varijacijama broja nefrona u ljudi i utječe na lučenje cistatina C (42).



**Slika 6.** Predviđena sekundarna struktura mRNA gena *OSRI* pri supstituciji nukleotida C s T na polimorfnom mjestu rs12329305. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 42.)

### 1.2.3. Gen *FOXF1* i polimorfizam u blizini gena *FOXF1*: rs9936833

Gen *FOXF1* (engl. *Forkhead Box F*) pripada obitelji gena *FOX* (engl. *Forkhead Box*), lociran je na kromosomskoj poziciji 16q24, (Slika 7) i ima 2 egzona (43). FOX proteini su transkripcijski faktori neophodni za normalan razvoj gastrointestinalnog sustava u miševa (44).



**Slika 7.** Smještaj gena *FOXF1* na kromosomu 16. (Preuzeto iz genomske baze podataka UCSC; dostupno na: <http://genome.ucsc.edu/>)

Brojne studije su pokazale da gen *FOXF1* svojom transkripcijskom aktivnošću modulira ekspresiju gena specifičnih tkiva (npr. pluća, crijeva) (45,46). Homozigotne mutacije *Foxf1* gena uzrokuju u miševa intrauterinu smrt varijabilnim fenotipom uključujući anomaliju pluća, suženje jednjaka i traheje, atreziju jednjaka i traheo-ezofagusnu fistulu (46).

Heterozigotne mutacije *FOXF1* gena nađene su u bolesnika s alveolo-kapilarnom displazijom s nepravilnim utokom pulmonalnih vena (engl. *Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of Pulmonary Veins - ACD/MPV*), koja je uvijek udruženu s malformacijama drugih organa (srca, gastrointestinalnog i urogenitalnog sustava) (47). Istraživanja su pokazala da perinatalno umrla djeca s multiplim malformacijama imaju heterozigotne mutacije gena *FOXF1* (48).

Nedavno objavljena cijelogenomska studija povezanosti (engl. *Genome-Wide Association Study - GWAS*) povezala je pojavu Barrettovog jednjaka s polimorfizmom rs9936833, u kojem je nukleotid T supstituiran s C. Ovaj polimorfizam je mapiran na 16q24.1 u nekodirajućem, intergenskom području DNA u blizini gena *FOXF1* (16q24), a poznato je da je protein FOXF1 uključen u razvoj i strukturu jednjaka (49). Spomenuti polimorfizam sadržava više DNA-vežućih mjesta za određene transkripcijske čimbenike kao što je FOXP2 (engl. *Forkhead Box Protein P2*), koji kontrolira ekspresiju gena *FOXF1* (49).

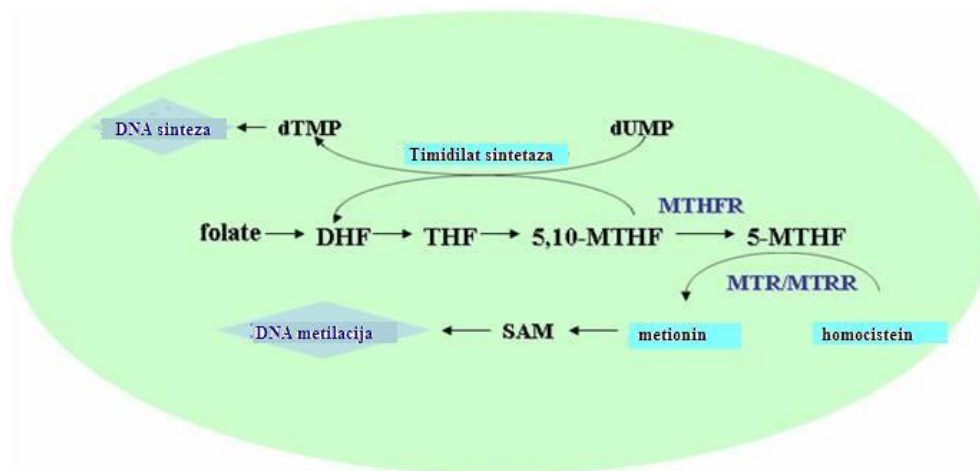
#### **1.2.4. Gen *MTRR* i polimorfizam gena *MTRR*: rs326119**

Gen metionin sintetaza (engl. *Methionine Synthase Reductase - MTRR*) kodira istoimeni enzim metaboličkog puta folata i homocisteina. Humani gen *MTRR* smješten je na petom kromosomu (5p15.2-15.3), veličine je oko 34 kb i sastoji se od 15 egzona i 14 introna (50). Tijekom proteklih 20 godina, niz kliničkih studija pokazao je da folna kiselina ima važnu ulogu za vrijeme embrijskog razvoja i da adekvatan unos folata prije i tijekom trudnoće smanjuje rizik nastanka PSG-a, iako osnovni molekularni mehanizam još uvijek nije poznat (51,52). Utjecaj folne kiseline na smanjenu prevalenciju rascjepa neuralne cijevi, PSG i rascjepa nepca povezuje se s individualnom genetskom podložnosti, a što je pokazano u istraživanjima brojnih polimorfničkih varijanti (polimorfizama) različitih gena uključenih u folatni metabolizam (53-57). Dokazano je da prekonceptijska primjena folata smanjuje rizik nastanka anomalija neuralne cijevi i posebno PSG za 40-60% (58,59). Široko je prihvaćeno mišljenje da pojava PSG-a, rascjepa usne i nepca ne ovisi samo o nedostatku folne kiseline, već tome znatno doprinosi i povišena razina homocisteina (engl. *homocysteinaemia - Hcy*) koja nastaje kao posljedica genetskog poremećaja u metabolizmu folata, a čemu također doprinose polimorfne varijante u genima za enzime uključenim u metabolizam folata (60-62). Na mišjem modelu dokazano je da mutacije u genu *Mtrr* mogu poremetiti razvoj fetusa zbog

promijenjenih koncentracija Hcy, metionina, 5-metiltetrahidrofolata i tetrahidrofolne kiseline (63).

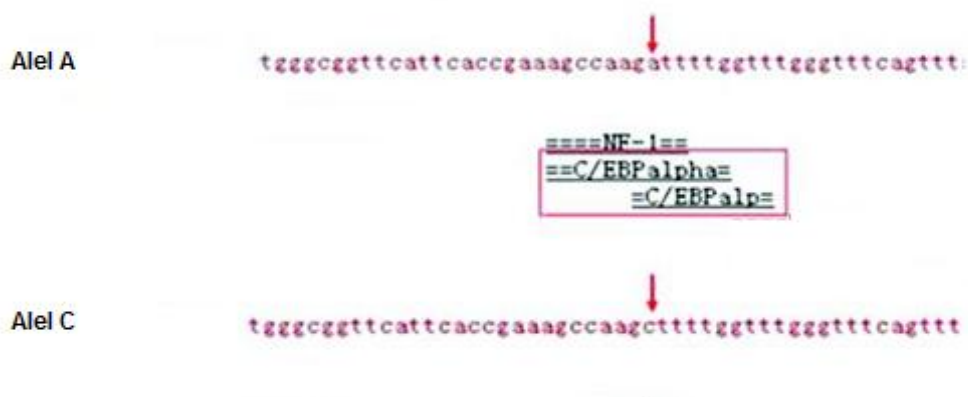
Enzim MTRR katalizira konverziju neaktivnog oblika enzima metionin sintetaze (engl. *Methionine Synthase* - MTR) u aktivno stanje koji onda katalizira remetilaciju Hcy u metionin. Ako taj proces nije adekvatan, smanjena količina MTRR smanjuje koncentraciju MTR, pa se posljedično snižava plazmatska koncentracija metionina, a raste koncentracija Hcy. Pretpostavlja se da u kritičnom razdoblju embrijskog razvoja srca (između 15 i 32 dana) smanjena količina esencijalne aminokiseline metionina i povećana količina Hcy utječe na nastanak PSG-a (64,65).

Najučestaliji polimorfizam gena *MTRR* u općoj populaciji, nastaje supstitucijom adenina u gvanin u kodonu 66 (A66G) uzrokuje zamjenu aminokiseline izoleucin u metionin (I22M), a povezuje se s povišenom koncentracijom Hcy u plazmi (66). Shematski prikaz razgradnje folata i sinteza metionina iz homocisteina prikazana je na slici 8 (67).



**Slika 8.** Shematski prikaz razgradnje folata i sinteze metionina iz homocisteina. DHF, dihidrotetrafolna kiselina; THF, tetrahidrofolna kiselina; 5,10-MTHF, 5,10-metilenetetrahidrofolat; 5-MTHF, 5-metiltetrahidrofolat; SAM, S-adenozilmetionin; MTHFR, metilenetetrahidrofolat reduktaza; MTR, metionin sintetaza; MTRR, metionom sintetazna reduktaza. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 67.)

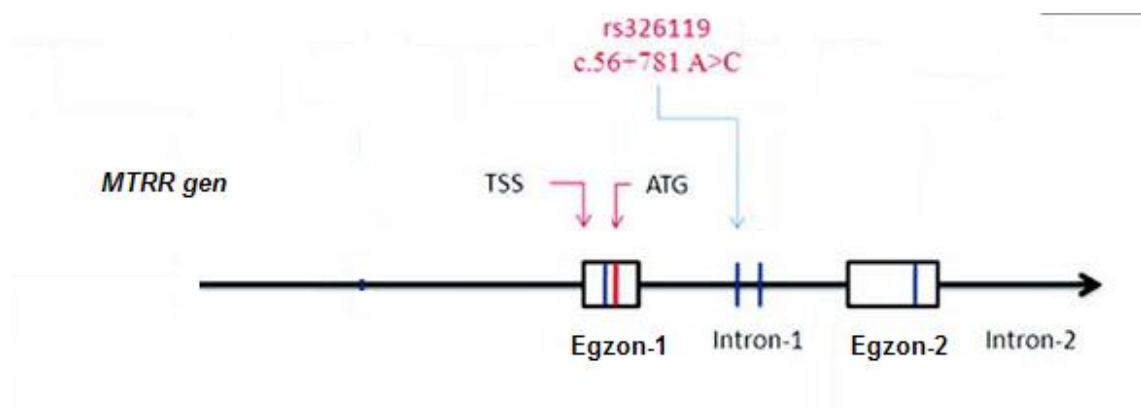
Nedavna istraživanja su pokazala da funkcionalni polimorfizam rs326119 (c.56+781 A>C) gena *MTRR* unutar prvog introna mijenja njegovu transkripcijsku aktivnost što uzrokuje smanjenje sinteze enzima, pa se posljedično akumulira Hcy, dok se koncentracija metionina smanjuje. Prisutnost polimorfizma rs326119 gena *MTRR* gdje je alel A supstituiran alelom C, uzrokuje slabljenje afiniteta prema specifičnom transkripcijskom čimbeniku CEBP $\alpha$  (engl. *CCAAT/Enhancer Binding Protein, alpha*) jer potonji izgubi izvorno mjesto za vezanje unutar prvog introna gena *MTRR* (slika 9) (65). Pretpostavka je da se *MTRR* dostatno prepisuje samo ako se vežu transkripcijski aktivatori. Prisustvo rjeđeg C alela smanjuje afinitet vezanja aktivatora te posljedično uzrokuje smanjenu transkripcijsku aktivnost gena *MTRR* (65).



**Slika 9.** Shematski prikaz polimorfizma rs326119 gena *MTRR*; alel A je supstituiran alelom C (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 65.)

Postojanje spomenutog polimorfizma u fetusa povezuje se sa sklonošću prema hipometioninemiji i hiperhomocisteinemiji kao nezavisnim čimbenicima rizika u razvoju PSG-a, ali povećava i njihovu individualnu genetsku podložnost za razvoj drugih već spomenutih PA uz postojanje prehranbenog manjka folne kiseline u majke.

Studija koja je uključila 2340 bolesnika s PSG-om pokazala je da je polimorfizam rs326119 (c.56+781 A>C), gena *MTRR*, učestaliji u bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu (2270 zdravih ispitanika) u kineskoj populaciji, dok istraživanja u drugim populacijama nisu provedena (65).



**Slika 10.** Shematski prikaz polimorfizma rs326119 (c.56+781 A>C) unutar gena *MTRR* s označenim transkripcijskim startnim mjestom (TSS) i startnim kodonom (ATG). (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 65.)



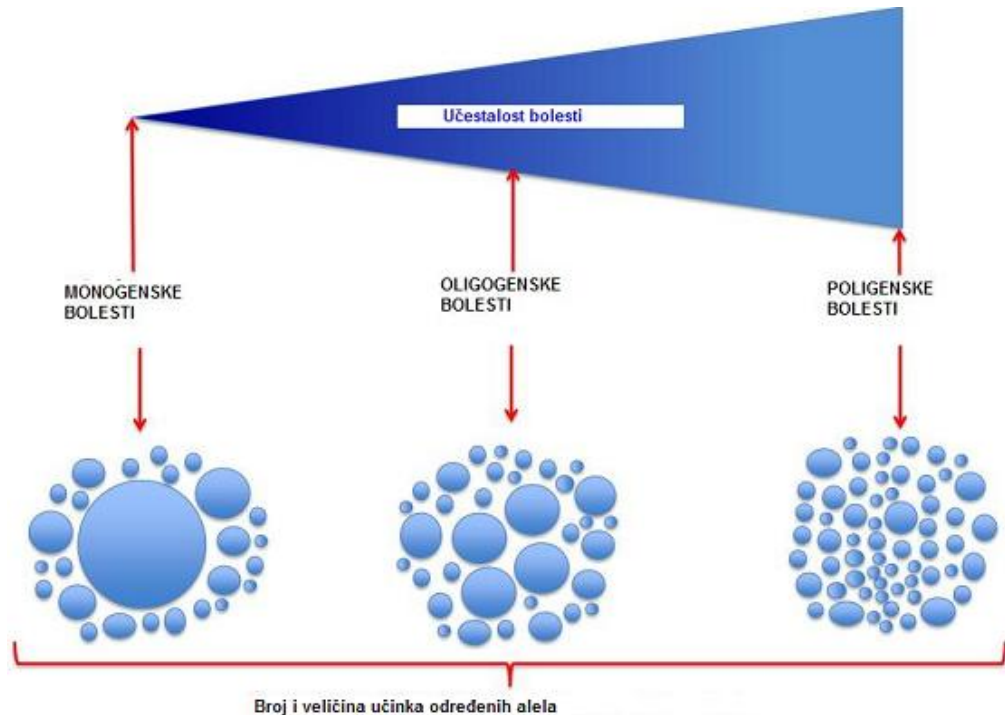
### 1.3. Genetički pristupi u istraživanju etiologije složenog fenotipa

Ljudski genom ima 3,2 milijarde parova nukleotida u molekuli DNA. Protein-kodirajuće sekvence (egzoni) čine manje od 1,5% ljudskog genoma (68). Osim toga, oko 26% ljudskog genoma čine introni (69). Osim gena (egzona i introna) i poznatih regulatornih sekvenci (8-20%), ljudski genom sadrži nekodirajuće regije DNA. Udio nekodirajuće DNA koji ima važnu ulogu u fiziologiji stanica je još uvijek predmet rasprave. Nedavna analiza ENCODE projekta pokazuje da 80,4% ukupnog ljudskog genoma pokazuje neki vid funkcionalne aktivnosti u najmanje jednom tipu stanica (70).

Ljudi se međusobno razlikuju u oko 0,1% genoma (71). Napretkom DNA tehnologija sekvenciranjem cijelog genoma ili samo egzona otkriven je veliki broj rijetkih varijanti u genomu koje se nazivaju DNA sekvencijske varijante (engl. *DNA Sequence Variants* – DSV), a koje mogu imati snažan učinak na fenotip složene bolesti. Svaki genom sadržava oko 4 milijuna DSV-ova koji zajedno utječu na pola gena u genomu a mnoge od njih su i privatni (pronađeni samo u jednoj obitelji ili maloj populaciji) (71). Uobičajeno su varijante svrstane u tri skupine prema učestalosti rjeđeg alela (engl. *Minor Allele Frequency* - MAF) u populaciji. Varijanta je učestala u populaciju ako je njen MAF veći od 5%, a rijetka ako je manji od 1%. Varijante s frekvencijom u populaciji između 1% i 5% smatraju se varijantama smanjene učestalosti (72). Velika većina DSV-ova u genomu su polimorfizmi u jednom nukleotidu (engl. *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP), a ima ih oko 3.5 milijuna u svakom genomu. U SNP-ovoj baza podataka (dbSNP) navodi se više od 37 milijuna varijanti (polimorfizama) među ljudima. SNP-ovi unutar kodirajućeg područja gena dijele se u dvije glavne skupine prema utjecaju na polipeptidni slijed kodirajućeg proteina, na sinonimne SNP-ove (sSNP) (engl. *synonymous*) ili nesinonimne (nsSNP) (engl. *non-synonymous*), a svega 10,000 SNP-ova su nesinonimni SNP-ovi i smatra se da imaju potencijalni efekt na fenotip (72). Ako SNP ne mijenja polipeptidni produkt gena, naziva se sinonimnim i nema utjecaj na funkciju proteina. Ako SNP uzrokuje promjene u kodirajućem polipeptidu, naziva se nesinonimnim SNP-om, može utjecati na funkciju proteina koji je često povezan s bolešću. SNP-ovi mogu biti locirani u intronima i regulatornim područjima gena pa mogu utjecati na razinu genske ekspresije, transkripcijsku aktivnost gena i prekranjanje mRNA (72).

Složeni klinički fenotip je rezultat djelovanja i interakcije između multiplih uzročnih alela s različitom staničnom genomikom i vanjskih čimbenika. U složenom fenotipu očekuje se da učinak uključenog alela varira od minimalnog do nerazumljivo velikog i značajnog

učinka (slika 11). Današnje studije otkrivaju alele s velikim učinkom. Veliki broj alela pokazuje skroman učinak, a koji se ne može utvrditi pristupom koji se danas primjenjuje u genetičkim studijama (73).



**Slika 11.** Odrednice složenog fenotipa. Učestalost bolesti i veličina učinka uzročnih alela. Prikazana je učestalost bolesti i broj određenih DSV-ova s njihovom veličinom učinka. Monogenske bolesti koje slijede Mendelski tip nasljeđivanja uzrokovane su rijetkom varijantom s velikim učinkom. Na suprotnom kraju spektra su učestale bolesti koje su dijelom nastale kao kumulativni učinak velikog broja DSV-ova, a svaka od njih sa skromnim učinkom. U oligogenskom fenotipu bolesti, nekoliko alela s učinkom srednje veličine i veliki broj alela s malim učinkom doprinose fenotipu. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 73.)

Najčešće primjenjivan pristup u genetičkom istraživanju složenog fenotipa je konvencionalni odabir kandidatnog gena. Ovaj pristup je temeljen na prethodnom znanju o potencijalnoj uključenosti istraživanog gena u patogenezi fenotipa. Isto tako SNP-ovi mogu biti izabrani temeljem poznate ili očekivane biološke funkcije, kao što je u slučaju nesinonimnih ili regulatornih SNP-ova (tablica 1) (73).

Alternativni pristup je nepristrano istraživanje velikog broja gena i varijanata, a obično i cijelog genoma u identifikaciji alela povezanih sa složenim fenotipom, kao što je GWAS (tablica 1) (73).

**Tablica 1.** Genetički pristupi u istraživanjima složenog fenotipa. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 73.)

### Kandidatni pristup

- *Kandidatni gen(i)*
  - Biološka vjerojatnost
  - Kromosomska pozicija mapirana analizom povezanosti ili GWAS-om
- *Kandidatni SNP(ovi)*
  - Biološka funkcija
  - Lokus pozicija mapirana analizom povezanosti ili GWAS-om
  - Neravnoteža vezanosti
- *Novi i poznati SNP-ovi*

### Objektivan (nepristan) pristup

- *Analiza lokusa za kvantitativna svojstva*
- *Ciljano subgenomsko sekvenciranje*
- *Sekvenciranje svih egzona*
- *Sekvenciranje cijelog genoma*
- *Sekvenciranje sljedeće generacije u kombinaciji s analizom povezanosti u obiteljima*

Genetičke studije složenih fenotipova su obično dizajnirane na hipotezama bilo kao učestala bolest – učestala varijanta (eng. *Common Disease – Common Variant* - CD-CV) ili rijetka varijanta – učestala bolest (engl. *Rare Variant – Common Disease* - RV-CD). GWAS se provodi na velikom broju ispitanika, a dizajniran je na hipotezi CD-CV i smatra se najuspješnijim modelom identifikacije učestalih varijanti u oligogenkim i poligenkim modelima nasljeđivanja. GWAS je identificirao više od 8900 genetičkih varijanti, uglavnom SNP-ova povezanih sa stotinama ljudskih osobina i bolesti, a definiraju se kao rizik-povezani lokus (engl. *risk-associated loci*) (74). Varijante koje utječu na funkciju proteina su mapirane u kodirajućim područjima gena, a mogu utjecati na sekvenciju proteina, brzinu translacije i

alternativno prekrajanje. Međutim, većina varijanti mapirana je u nekodirajućim intergenskim i intronskim područjima. Procjena funkcionalnosti tih varijanti novi je izazov u molekularnoj biologiji. Mnoge od njih utječu na ekspresiju gena modulirajući regulatorne elemente promotorskog područja (*cis*-djelujuće područje), ometaju koordiniranu gensku ekspresiju, a njihov fenotipski učinak se teško procjenjuje (74). DSV-ovi mogu imati snažan učinak na fenotip složene bolesti. Stoga su oni postali fokus istraživanja novo postavljene hipoteze RV-CD. Multiple rijetke varijante s velikim učinkom na fenotip glavne su odrednice nasljednosti složenog fenotipa. DSV-ovi utječu na ekspresiju složenog fenotipa ne samo direktnim utjecajem već utječu i na različite komponente genoma koje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena kao što je modifikacija histona, mikroRNA, na dugu-nekodirajuću RNA, epigenetiku, na prekrajanje mRNA (engl. *splicing*), posttranslacijsku modifikaciju kodirajućih proteina u kombinaciji s čimbenicima okoliša (73).

Najčešće studije kojima se pokušava otkriti povezanost nekog polimorfizma s složenim fenotipom su tzv. *case-control* studije. U takvim studijama testira se razlika u učestalosti alela i genotipova kandidatnog gena između dvije skupine oboljelih i kontrolne skupine. Testira se je li se polimorfizam gena od interesa nalazi u većoj učestalosti u populaciji bolesnih u odnosu na zdravu populaciju. Izbor gena kandidata *case-control* studije usmjeren je na prethodno poznatoj umiješanosti gena od interesa u patogenezu fenotipa (tablica 1) (73). Sveobuhvatniji pristup analize istraživanja velikog broja gena i njihovih varijanata pokazuju *case-control* GWAS studije koje se baziraju na analizi bez hipoteze o kandidatnosti gena. Poželjne ali skupe studije se baziraju na sekvenciranju cijelog genoma ili ciljanih regija kod velikog broja ispitanika i kontrola (73).

Obiteljske studije (engl. *family-based study*) koje često obuhvaćaju samo tri člana obitelji (engl. *parent-offspring trios*) omogućavaju snažan pristup u otkrivanju varijanata koje se povezuju sa složenim fenotipom. Obiteljske studije pokazuju manju osjetljivost na heterogenost strukture stanovništva od *case-control* studija. U takvim studijama određuje se alel koji se preferencijalno nasljeđuje s roditelja na oboljelo potomstvo (73).

Prospektivna studija je varijanta studije povezanosti alela (engl. *prospective allelic association study*) u kojoj se genotipiziraju različiti SNP-ovi ili čak sekvencira genom kod velikog broja ispitanika koji se potom prospektivno prate i fenotipiziraju. Prospektivna studija ima veću snagu u otkrivanju veličine učinka uzročnih alela (73).

### 1.3.1. Pregled dosadašnjih istraživanja u genima uključenim u embrionalni razvoj čovjeka

Mutacije gena uključenih u regulaciju morfogeneze i diferencijacije vrlo su rijetke, često letalne ili imaju plejotropni efekt na fenotip pa se očituju kao izolirane ili multiple malformacije (28,29,37,38,47). Patogeneza abnormalnog razvoja pojedinog organa tijekom embrijskog razvoja čovjeka nije poznata. Istraživanje varijanti gena uključenih u razvoj i njihov doprinos razvojnoj anomaliji/anomalijama novi je izazov suvremene genetike.

Dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost između polimorfizma gena za *BMP4* (engl. *Bone Morphogenetic Proteins*) i AMS posebice sa specifičnim malformacijama kao što su multicistični bubrezi i opstrukcija ureteropelvičnog pripoja bubrega, ali ne i s vezikoureteralnim refluksom u studiji povezanosti provedenoj u brazilskoj populaciji (75). Istraživanja McBride i sur. pokazala su povezanost varijante gena *ERBB4* (engl. *v-Erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 4*) u evolucijski očuvanom području tog gena, s PSG-om i to s opstrukcijom izlaznog trakta lijeve klijetke u europskoj populaciji, dok se rs2295418, SNP u genu *LEFTY2* (engl. *Left-Right Determination Factor 2*) povezuje s PSG-om u kineskoj populaciji (76,77).

Polimorfizmi rs3758249 i rs4460498 gena *FOXE1* (engl. *Forkhead Box E1*) transkripcijskog čimbenika snažno su povezane s nesindromskim rascjepom usne i nepca u studiji provedenoj u europskoj populaciji (78). Neke od studija pokazale su povezanost između majčine varijante C677T gena *MTHFR* i povećanog rizika rađanja djece s PSG-om u kineskoj populaciji (79). Polimorfizmi transkripcijskog faktora gena *PAX2* (engl. *Paired Box 2*) čimbenici su rizika u patogenezi vezikoureteralnog refluksa u pedijatrijskoj populaciji Brazila (80).

Prethodno izneseno otvara pitanje kolika je stvarna važnost varijanti (polimorfizama) gena koji su uključeni u embrijski razvoj čovjeka.

### 1.3.2. Kriteriji odabira kandidatnih polimorfizama u našoj studiji

Polazeći od već davno poznate činjenice da ista PA u različitim osoba može imati različitu etiologiju u ovoj smo studiji izabrali četiri gena *HOXA1*, *OSR1*, *FOXF1* i *MTRR* koji su uključeni u patogenezu abnormalnog razvoja bilo čovjeka i/ili drugih vrsta (miša) (2,27,28,38,44,51). Primjerice svi spomenuti geni uslijed disfunkcije svojih kodirajućih proteina mogu posljedično uzrokovati PSG. Izabrani geni evolucijski su očuvani što znači da pokazuju veliku homolognost sekvencije s genima drugih vrsta, stoga nam istraživanje fenotipskog učinka mutacija ovih gena u drugim vrsta može pomoći u otkrivanju njihove uloge u poremećajima embrijskog ili fetalnog razvoja čovjeka (28,37,43,63,65). Mutacije svakog od ovih gena (*HOXA1*, *OSR1*, *FOXF1* i *MTRR*) imaju plejotropan fenotipski učinak koji se očituje PA-ma različitih organa, a koje nerijetko uzrokuju smrt ploda ili novorođenčeta (29,30,38,47,48,63). Mutacije gena *HOXA1* u čovjeka uzrokuju anomalije SŽS, gluhoću i kardiovaskularne anomalije, dok mutacije gena *OSR1* do sada nisu povezane s kliničkim fenotipom u čovjeka, ali mutacije ovog gena (*Osr1*) u miša uzrokuju letalne malformacije srca i bubrega (29,30,38). Mutacije gena *FOXF1* posljedično ostavljaju multiple malformacije na više organskih sustava u čovjeka (kardiopulmonalni, gastrointestinalni i urogenitalni sustav) s velikim, uglavnom letalnim disfunkcijama tih organskih sustava, stoga su nađene isključivo u mrtvorodene djece (47,48).

Mutacije gena *MTRR* koji kodira istoimeni enzim uključen u metabolički put folata i Hcy i u miša i u čovjeka posljedično mjenjaju koncentracija Hcy, metionina, 5-metilentetrahidrofolata i tetrahidrofolne kiseline u serumu stoga u fetusa mogu dovesti do pojave PSG, rascjepa neuralne cijevi i rascjepa usne i nepca (53-57).

Selekcija kandidatnih polimorfizma istraživanih gena uključenih u prenatalni razvoj čovjeka temeljena je na njihovoj gore spomenutoj biloškoj funkciji ili na povezanosti lokus pozicije s određenom anomalijom (31,42,49,65).

Polimorfizmi rs10951154 gena *HOXA1* i rs12329305 gena *OSR1* mapirani su u kodirajućim regijama svojih gena i utječu na ekspresiju svojih proteina. Njihovi proteinski produkti imaju funkciju transkripcijskih čimbenika pa tako direktno utječu na regulaciju ekspresije jednog ili više gena tijekom humane embriogeneze (31,42). Stoga smo pretpostavili da smanjena količina ili disfunkcija spomenutih proteina s ulogom transkripcijskih čimbenika za vrijeme embrijskog/i fetalnog razvoja čovjeka može uzrokovati heterogenu skupinu poremećaja kao što je razvojna anomalija/e jednog ili više organa.

Do sada ni jedan od spomenutih polimorfizama nije ispitan u studijama povezanosti u perinatalno/neonatalno umrlih ispitanika zbog različitih PA.

Od ovog istraživanja očekivali smo da se polimorfni alel G polimorfizma rs10951154 gena *HOXA1* učestalije pojavljuje u ispitanika s razvojnih anomalija srca, mozga i posljedično neurokranija, a s druge strane i da se polimorfni alel T polimorfizma rs12329305 gena *OSR1* učestalije pojavljuje kod ispitanika s razvojnih anomalija srca i mokraćnog sustava.

Druga dva polimorfizma mapirana su u nekodirajućim područjima DNA. Polimorfizam rs9936833 mapiran je u nekodirajućem intergenskom području DNA u blizini gena *FOXF1* i vjerojatno modulira ekspresiju gena *FOXF1* posredstvom transkripcijskog čimbenika *FOXP2* (49), a fenotipski učinak ove varijante do sada je povezan s fenotipom Barretova jednjaka. U našem istraživanju očekujemo povezanost polimorfnog alela C s fenotipom multiplih malformacija u skupini perinatalno i neonatalno umrle djece, a pretpostavka je temeljena na tome da je ometena spomenuta biološka funkcija gena *FOXF1*.

Polimorfizam rs326119 smješten je u intronskom području gena *MTRR* i modulira regulatorne elemente promotorskog područja gena *MTRR* i tako ometa njegovu transkripciju (65). Funkcionalne analize pokazale su da varijanta rs326119, gena *MTRR* značajno smanjuje njegovu transkripcijsku aktivnost, a fenotipski učinci ometane genske ekspresije povezuju se s nastankom PSG-a (65). Očekivali smo da ćemo prisutnost polimorfnog alela C ove varijante povezati s ispitanicima koji imaju bilo PSG bilo kraniofacijalne i anomalije rascjepa neuralne cijevi.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI

### 2.1. Hipoteza

Pregledom dosadašnjih istraživanja odabrali smo polimorfizme tri gena (*OSRI*, *HOXA1* i *FOXF1*) koji kodiraju istoimene proteine s funkcijom transkripcijskih čimbenika i jedan polimorfizam gena metaboličkog enzima (*MTRR*), uključenog u folatni metabolizam, a koji je vrlo važan tijekom embrijskog razvoja. Sva četiri polimorfizma utječu na ekspresiju bilo svojih ili drugih gena tijekom humane embriogeneze i posljedično uzrokuju disfunkciju svojih kodirajućih proteina. Stoga pretpostavljamo da su uključeni u patogenezu PA. Ni jedan od spomenutih polimorfizama do sada nije ispitan u studijama povezanosti u perinatalno/neonatalno umrlih ispitanika zbog različitih prirodnih anomalija.

Stoga smo u ovom istraživanju postavili hipotezu:

**Polimorfizmi gena *HOXA1* (rs10951154), *FOXF1* (rs9936833), *OSRI* (rs12329305) i *MTRR* (rs326119) tijekom embrijskog razvoja doprinose povećanom riziku nastanka izoliranih i/ili multiplih prirodnih anomalija.**



## 2.2. Ciljevi

1. Ispitati jesu li polimorfizmi gena: *HOXA1* (rs10951154), *FOXF1* (rs9936833), *OSRI* (rs12329305) i *MTRR* (rs326119) čimbenici rizika za nastanak prirođene anomalije, a posebno specifičnog tipa prirođene malformacije u djece umrle u perinatalnom i/ili neonatalnom razdoblju u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.
2. Ispitati povezanost polimorfizama gena *HOXA1* (rs10951154), *FOXF1* (rs9936833), *OSRI* (rs12329305) i *MTRR* (rs326119) s dobi trudnoće, porođajnom težinom, porođajnom duljinom mrtvorođenih i živorođenih, kronološkom dobi živorođenih i spolom ispitanika.
3. Odrediti najčešću pojavnost jedne ili više morfoloških anomalija različitih organa ili dijelova tijela u perinatalno i neonatalno umrlih ispitanika koje ne nalazimo ili se rijetko nađu u dojenačkoj ili kasnijoj životnoj dobi, te provjeriti njihovu povezanost s polimorfizmom gena *HOXA1* (rs10951154), *FOXF1* (rs9936833), *OSRI* (rs12329305) i *MTRR* (rs326119) što bi moguće pridonijelo razumijevanju etiologije smrti.

## **3. ISPITANICI I METODE RADA**

### **3.1. Ustroj istraživanja**

Specifični ustroj koji se koristio je analiza povezanosti ispitanika i kontrola (*case control* studija), a s obzirom na učestalosti ispitivanih polimorfizama između dvije skupine bolesnika i kontrolne skupine. Glede načina dobivanja podataka riječ je o opazajnom istraživanju dok je vremenska orijentacija bila retrospektivna budući da je konačna dijagnoza PM u fetalno i neonatalno umrle djece postavljena temeljem nalaza patološko anatomske obdukcije. Unutar ispitivane skupine napravljena je i analiza povezanosti genotipa i fenotipa.

### **3.2. Etička načela**

Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split odobrilo je provođenje istraživanja. U istraživanju su poštovani temeljni etički i bioetički principi (osobni integritet-autonomnost, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost) u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije (World Medical Association Declaration of Helsinki – 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.) i u skladu s hrvatskim zakonima (Hrvatski liječnički zbor – Kodeks medicinske etike i deontologije, Zagreb, 2002). Uobičajeni medicinski podaci prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim principima, osigurala se privatnost (medicinska tajna) ispitanika/bolesnika uključenih u istraživanje i zaštitila tajnosti podataka. Materijal se koristio isključivo za dobivanje znanstvenih rezultata, a ne za stjecanje dobiti.

### **3.3. Ispitanici**

#### **3.3.1. Kriterij odabira ispitanika i razvrstavanje u skupine**

U ovo istraživanje uključeno je 340 ispitanika, od toga 140 fetalno ili neonatalno umrle djece s prirođenim malformacijama (PM) (PM skupina), i 200 zdrave djece (kontrolna skupina).

### ***Skupina ispitanika s prirođenim malformacijama***

Izdvojili smo uzorke tkiva parafinskih kocki fetalno ili neonatalno umrle djece, arhivirane u razdoblju od siječnja 2000. do prosinca 2011. godine pri Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, poštujući dolje napisane kriterije.

Uključni kriteriji bili su:

- dokaz o postojanju najmanje jedne morfološke anomalije nekog organa ili dijelova tijela prema Merksu i sur. (81),
- porođaj nakon 28. tjedna trudnoće,
- fetusi kojima je dijagnosticirana intrauterina smrt ultrazvukom prije rođenja ili novorođenče umrlo do 28-og dana života.

Neonatalna smrt se definira kao smrt u prva 4 tjedna života živorođene novorođenčadi.

Isključni kriteriji bili su:

- perinatalno i neonatalno umrli u kojih je dokazana konatalna infekcija, fetalni hidrops i macerirani plodovi,
- ispitanici u kojih je klinički ili patoanatomski dijagnosticirana neka monogenska bolest,
- ispitanici u kojih je postojao podatak o majčinoj bolesti, uzimanju teratogenih lijekova, droge i alkohola.

Svi podaci o demografskim karakteristikama kao što je spol, dob trudnoće, porođajna duljina i težina, kronološka dob i klinički podaci o prirođenim malformacijama dobiveni su retrospektivnom analizom iz medicinske dokumentacije Zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu i Klinike za dječje bolesti KBC-a Split.

Klasičnom citogenetskom kariotipizacijom dobiveni su kariotipovi djece bilo prenatalno iz amniocita plodove vode ili nakon rođenja iz periferne krvi. Svi ispitanici, ukupno njih 140, podjeljeni su u dvije skupine s obzirom na nalaz kariotipa:

1. skupina: 20 ispitanika s dokazanom kromosomskom aberacijom
2. skupina: 120 ispitanika nedokazane genetičke etiologije.

Ovu drugu skupinu ispitanika razvrstali smo u dvije podskupine ovisno o kliničkom nalazu morfološke anomalije/anomalija:

a) Podskupina s izoliranim PM: konačna dijagnoza izolirane malformacije postavljena je na osnovu nalaza patološkoanatomske obdukcije ili kliničkim ispitivanjem, a uključuje morfološku anomaliju jednog organa. Nadalje, s obzirom na specifičnu vrstu organa ili

organskog sustava gdje je nađena jedna morfološka anomalija podijelili smo ih u četiri kategorije: PSG; kraniofacijalne anomalije, anomalije SŽS i rascjepa neuralne cijevi; anomalije gastrointestinalnog sustava (GIS) i AMS-a.

b) Podskupina s multiplim PM: konačna dijagnoza multiplih malformacija postavljena je temeljem nalaza patološkoanatomske obdukcije ili kliničkim ispitivanjem, a potom potvrđena nalazom patološkoanatomske obdukcije, a uključuje morfološke anomalije više organa ili organskih sustava. U ovu skupinu uključili smo neke prepoznatljive malformacije/sekvencije poput VATER asocijacije, različite tipove Potter sindroma, Prune Belly sindroma itd.

### ***Kontrolna skupina ispitanika***

Ova skupina uključivala je 200 djece u dobi od 0 do 18 godina bez prirodnih malformacija, a koja su liječena zbog neke akutne bolesti na Klinici za dječje bolesti KBC-a Split. Ispitanicima je uzet uzorak venske krvi radi standardne dijagnostičke obrade u svrhu procjene hematoloških i biokemijskih pokazatelja potrebnih za nadzor i liječenje njihove bolesti, a izdvojila se 1 epruveta krvi (2 ml) presvučena EDTA-om iz koje smo izolirali DNA.

### **3.3.2. Snaga istraživanja**

Potrebna veličina uzorka procijenjena je temeljem omjera izgleda (engl. *odds ratio* - OR) koji za pojedinačne polimorfizme iznosi: rs10951154 OR = 2,1; rs326119 OR = 1,9; rs9936833 OR = 1,9. Da bi snaga studije bila 80% uz statističku značajnost od 0.01 izračunali smo da nam je potrebno 140 ispitanika po skupini korištenjem statističkog programa Quanto (82). Analiza fenotipskih krajnosti pojačava snagu studije (83). Stoga i u ovoj studiji bez obzira što vrijednosti OR-a ukazuju na graničnu snagu moramo istaknuti da je riječ o specifičnom uzorku ispitanika. Svi ispitanici skupine PM imali su morfološke anomalije od velikog kliničkog značaja tzv. *major* anomalije i to uglavnom letalnog tipa, a s druge strane kontrolnu skupinu činila su zdrava djeca bez PM (ekstremna razlika u fenotipu). Stoga rezultate dobivene ovakvom snagom studije smatramo značajnim u perinatalnoj patologiji.

Za polimorfizam rs12329305 OR nije prikazan zbog toga što učestalost rjeđeg alela za opću populaciju iznosi svega 2,2%, a homozigoti za rjeđi homozigoti nisu pronađeni prema

podacima NCBI dbSNP (National Center for Biotechnology Information SNP database) za srednjoeuropsku populaciju (engl. *Central European* - CEU).

Sukladno tome, rs12329305 je polimorfizam s niskom frekvencijom rjeđeg alela. Neke studije definiraju varijante s frekvencijom rjeđeg alela između 0,1% i 3% kao rijetke varijante i ukazuju na to da one rijetke ponekad pokazuju veći utjecaj na nastanak nekog fenotipa nego li učestale varijante (84).

## **3.4. Metode**

### **3.4.1. Genotipizacija uzoraka**

Izolacija DNA i genotipizacija izvedeni su u Laboratoriju za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Genotipiziranje je metoda molekularne biologije kojom se utvrđuju specifični nukleotidi, odnosno aleli na dva homologna kromosoma ispitanika u istraživanih polimorfizama, a temeljem kojih se određuje i genotip pojedinca. U ovom istraživanju određivali smo polimorfne varijante sljedećih gena: *HOXA1* (rs10951154), *FOXF1* (rs9936833), *OSR1* (rs12329305) i *MTRR* (rs326119).

### **3.4.2. Izolacija DNA**

Za skupinu ispitanika fetalno i neonatalno umrle djece s PM-om izolirali smo DNA iz arhiviranih uzoraka formalinom fiksiranih u parafin uklopljenih (engl. *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded* - FFPE) različitih tkiva. Sterilno odrezane tkivne uzorke debljine 5 mikrona odložili smo u tubicu od 1.5 ml, deparafinizirali ksilolom na miješalici, potom centrifugirali pri 14.000 rpm tijekom 2 minute, odbacili supernatant, a talog smo dalje tretirati prema priloženim uputama proizvođača QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Izolacija DNA se sastoji od nekoliko faza: razbijanja stanica i jezgara, uništavanja svih staničnih proteina, RNA i ostalih makromolekula, oslobađanja i čišćenja DNA od preostalih proteina i skladištenja DNA.

Za kontrolnu skupinu genomska DNA je izolirana iz leukocita periferne krvi prema priloženom protokolu proizvođača QIAamp DNA Blood Mini Kit-ova (Qiagen, Hilden,

Njemačka). Izolacija se sastoji od nekoliko faza: razbijanja stanica i jezgara, uništavanja svih staničnih proteina, RNA i ostalih makromolekula, oslobađanja i čišćenja DNA od preostalih proteina i skladištenja DNA.

Koncentracija izolirane DNA se odredila mjerenjem na NanoDrop spektrofotometru 1000 (Thermo Scientific, SAD). Za metodu genotipiziranja uzorak je razrijeđen do koncentracije od 10 ng/μl.

### 3.4.3. Genotipizacija četiri polimorfizma pomoću *real-time* PCR metode

Polimorfizmi gena uključenih u razvoj *HOXA1* (rs10951154), *FOXF1* (rs9936833), *OSRI* (rs12329305) i gena *MTRR* (rs326119) za metabolički enzim MTRR analizirani su metodom polimeraza lančane reakcije u stvarnom vremenu (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction* - RT PCR) pomoću ABI 7900 (real-time) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

*Real-time* PCR je kvantitativna metoda kojom se u svakom trenutku reakcije može vidjeti povećanje u količini DNA produkta.

Za određivanje alela ova metoda koristi alel-specifične fluorescentne oligonukleotidne probe koje na svojim krajevima sadržavaju dvije fluorescentne boje, reportere. Sljedovi alel-specifičnih fluorescentnih oligonukleotidnih proba za umnažanje PCR-a za četiri istraživana polimorfizma (SNP-a) bili su:

- rs12329305 C\_25994108\_20 VIC/FAM, CCGCAGTGCCGCACCTGTGGTCTCG [C/T]  
AGGTGGTCTTGCCCTCCGGAAGGCTT
- rs9936833 C\_1937647\_20 VIC/FAM, TTTAACAAAACAGAAGTCAAAAGCA [C/T]  
TGCCACTCTCTACCACCCTCCTAGA
- rs10951154 C\_27262818\_10 VIC/FAM, CTGGTAGGTAGCCGGCTGGGGGTGG [C/T]  
GATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTG
- rs326119 C\_3068178\_10 VIC/FAM, GGCGGTTTCATTCACCGAAAGCCAAG [A/C]  
TTTTGGTTTGGGTTTCAGTTTAAAT

U ovoj metodi se primjenjuju dvije vrste fluorescentnih proba koje se razlikuju u jednoj bazi i boji kojom fluorescira reporter. Boje koje se najčešće koriste su VIC (zelena) i FAM (plava). Na drugom kraju probe nalazi se suzbijajuća boja, *quencher* koja ometa signal s boje reportera kada su kratko udaljene jedna od druge. TaqMan probe, koje sadržavaju molekulu koja se veže za 3' kraj novorastućeg lanca (engl. *Minor Groove Binder* - MGB),

pružaju vrhunske rezultate u određivanju alela. MGB molekula veže za manji utor DNA uzvojnice čime stabilizira kompleks MGB-probe i lanca kalupa. Daljnju stabilizaciju osigurava duljina probe do 13 baza, što dodatno osiguravaju nemogućnost sparivanja neusklađenih baza (engl. *mismatch*). Dok je proba prihvaćena za kalup DNA prije nego polimeraza započne svoju aktivnost, *quencher* onemogućava fluorescenciju s reportera. Kada se proba veže za specifično mjesto na DNA kalupu nakon denaturacije, reakcija se hladi i početnice se vezuju za DNA. Započinje djelovanje Taq Gold DNA polimeraze koja dodaje nukleotide. Detekcija se postiže pomoću egzonukleaznog cijepanja 5' alel-specifičnih boja probe. Tada se razdvaja *quencher* od reportera što dozvoljava reporteru da emitira svoju energiju, odnosno da fluorescira. Suzbijajuća boja *quencher* gotovo da eliminira pozadinsku fluorescenciju povezanu s klasičnim *quencherom* i pruža jači signal i vrhunsku osjetljivost eseja. Uz pomoć računala to se može kvantificirati te odrediti genotip osobe. Fluorescentni signal daje proba koja se vezala, čitač fluorescencije bilježi količinu fluorescencije i automatski određuje genotip: homozigoti za jedan alel pokazuju samo zelenu fluorescenciju, homozigoti za drugi alel samo plavu fluorescenciju dok heterozigoti pokazuju obje fluorescencije.

#### **3.4.4. Statistički postupci**

Statistička obrada podataka je podijeljena u dva dijela na: analizu kvalitete i analizu povezanosti.

##### **3.4.4.1. Analiza kvalitete**

U prvom dijelu analizirana je kvaliteta dobivenih genotipova (engl. *quality control analysis*). Provjere kvalitete su nužne jer omogućavaju otkrivanje pogrešaka prilikom genotipiziranja (tj. dodjeljivanja genotipa pojedincu) koje mogu utjecati na rezultat, odnosno koje mogu prouzročiti lažno pozitivnan ili lažno negativnan nalaz. U ovoj doktorskoj disertaciji analiza kvalitete, a koja je uključila uspješnost genotipiziranja, učestalost MAF-a i Hardy-Weinberg ravnotežu za sva četiri istraživana polimorfizma kod ispitivane i kontrolne skupine provjerena je programom Haploview 4.1. (85).

### Provjera Hardy-Weinberg ravnoteže

Engleski matematičar Hardy i njemački liječnik Weinberg donijeli su 1908. god. pravilo o konstantnoj frekvenciji alela i genotipova u nekoj populaciji koja se ne mijenja iz generacije u generaciju. Pravilo vrijedi samo za populacije koje su u genetičkoj ravnoteži, a to su populacije bez mutacija, migracije, genetičkog drifta (slučajne promjene genetičke strukture uzrokovane vanjskim utjecajem) i prirodne selekcije (86,87).

$p$  = frekvencija dominantnog alela A

$q$  = frekvencija recesivnog alela a

$$p + q = 1$$

$$(p + q)(p + q) = p^2AA + 2pqAa + q^2aa$$

$$\text{HARDY-WEINBERGOVA JEDNADŽBA: } (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

HW (Hardy-Weinberg) pravilo povezuje frekvenciju pojedinog alela s frekvencijom pripadajućeg genotipa u populaciji diploidnih jedinki i može se izračunati za svaki alel. Odstupanje od HW ravnoteže u zdravih jedinki može značiti da su nastale nepravilnosti prilikom genotipiziranja ili ukazati na populacijsku stratifikaciju u uzorku. Odstupanje od HW ravnoteže u bolesnika može ukazivati na povezanost istraživanog polimorfizma s ispitivanim fenotipom ili bolesti (88).

### Učestalosti MAF-a

Za provjeru uspješnosti genotipiziranja najčešće se računaju i uspoređuju učestalosti rjeđeg alela. Učestalost MAF-a može se međusobno uspoređivati unutar iste ili između bliskih populacija i trebala bi imati vrlo slične vrijednosti. Ujedno provjera MAF-a između kontrolne skupine i opće populacije služi nam kao moguća analiza kvalitete. U našem istraživanju provjerili smo učestalosti MAF-a naše kontrolne skupine za četiri istraživana polimorfizma *HOXA1* rs10951154, *FOXF1* rs9936833, *OSR1* rs12329305 i *MTRR* rs326119, a dobivene vrijednosti su uspoređene s podacima baze podataka NCBI dbSNP za srednjoeuropsku populaciju.

### Uspješnost genotipiziranja

U našem istraživanju uspješnost genotipiziranja bila je 91,8%, a nakon što smo ponovili genotipiziranje s većom koncentracijom DNA u uzorku, uspješnost je porasla na 96,5%.

Uspješnost genotipiziranja ovisi o veličini PCR fragmenta (amplikonu) kod uzoraka DNA dobivenih iz arhiviranog tkiva. Poznato je da formalin smanjuje učinkovitost PCR reakcije zbog unakrsnog povezivanja s proteinima. Dok je morfologija tkiva dobro sačuvana,



degradacija nukleinskih kiselina se povećava s vremenom pohrane i ovisna je o pH vrijednosti impregnacije tkiva (89). Zbog degradacije DNA, samo kratke sekvencije mogu biti uspješno amplificirane iz ove vrste tkiva, obično manje od 100 baza do maksimalno 300. S rastom veličine amplificirane sekvencije uspješnost genotipiziranja opada. To je problem, jer istraživanja polimorfizama i mutacija unutar velikih gena često zahtijevaju analizu dugih sekvencija (90).

#### **3.4.4.2. Analiza povezanosti**

Drugi dio statističke obrade bila je analiza povezanosti (engl. *association analysis*) koja je provedena primjenom programa Haploview 4.1. (85). Ovom se analizom pokušalo utvrditi postoji li povezanost ispitivanih alela svakog pojedinačno istraživanih polimorfizma s PM.

##### Razlike u frekvenciji alela između kontrolne i skupine bolesnika s prirođenim malformacijama i njenih podskupina

Analizirana je povezanost alelske distribucije svakog pojedinog polimorfizma s pojavom prirođenih malformacija/kromosomske aberacije primjenom programa Haploview 4.1. (85).

Nakon Bonferronijeve korekcije za multiplo testiranje p vrijednost manja od 0.0125 smatrana je statistički značajnom.

##### Razlike u frekvenciji genotipova između kontrolne i ispitivane skupine

Primjenom hi-kvadrat testa ( $\chi^2$ ) i logističke regresije (program Statistika 7.0 i SPSS) analizirali smo genotipsku distribuciju za svaki pojedini polimorfizam.

Univarijatna i multivarijatna logistička regresija s PM kao zavisnom varijablom te genotipovima kao prediktorima koristila se za direktnu usporedbu (omjer izgleda) te za pronalaženje kombinacije prediktora koja predviđa PM bolje od pojedinačnih biomarkera (usporedba mjera prikladnosti regresijskih modela).

Vrijednosti kategorijskih varijabli između skupina uspoređivale su se  $\chi^2$ -testom. Rezultati su se interpretirali na razini značajnosti  $p \leq 0.05$  uz korištenje statističkog paketa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, SAD).

### Povezanost raspodjele genotipova s određenim fenotipskim karakteristikama unutar ispitivane skupine

Razlike u pojavnosti karakteristika kao što su spol, gestacijska dob mrtvorodenih i živorođenih, kronološka dob živorođenih, porođajne težine i duljine ispitanika određene su  $\chi^2$  testom koristeći program SPSS.

Univarijatnom logističkom regresijom izračunat je OR za pojavnost prirodene malformacije/a u odnosu na genotipove istraživanih polimorfizama.

Statistička obrada razlika u zastupljenosti određene morfološke anomalije/anomalija između ispitanika s dokazanim polimorfnim alelom i ispitanika u kojih nije dokazana polimorfna varijanta u genotipu analizirana je pomoću hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa i logističke regresije koristeći također program SPSS. Rezultati su interpretirani na razini značajnosti od  $p < 0,05$  i nisu korigirani po Bonferronijevoj korekciji za multiplo testiranje.

Analiza povezanosti četiri proučavana polimorfizma s različitim kliničkim parametrima prilagođena za spol ispitanika učinjena je multivarijatnom binarnom logističkom regresijom.

## 4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 340 djece, od toga 140 djece s prirođenim malformacijama (PM) umrle u fetalnom i neonatalnom razdoblju (PM skupina) i 200 zdrave djece (kontrolna skupina). Raspodjela ispitanika po skupinama i raspodjela po spolu prikazane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Prikaz ispitanika prema broju i spolu u PM i kontrolnoj skupini

Karakteristike skupine	PM skupina	Kontrolna skupina
Broj ispitanika (No)	140	200
Spol M/Ž* (No)(%)	85(60,7)/55	98(49,0)/102

\*M=muško; Ž=žensko

U PM skupini bilo je značajno više djece muškog spola ( $\chi^2=4,08$ ;  $p=0,043$  uz Yatesovu korekciju).

Udio mrtvorodene djece među ispitanicima s PM bio je 30 (21,4%) dok je udio djece koja su umrla u neonatalnom razdoblju bio 110 (78,6%) (tablica 3).

**Tablica 3.** Prikaz neonatalno umrle i mrtvorodene djece u PM skupini prema spolu i dobi trudnoće

	Neonatalno umrli		Mrtvorodeni		Ukupno
	(No)	(%)	(No)	(%)	
Broj ispitanika	110	(78,6)	30	(21,4)	140
Muško/Žensko	68/42	(61,8/38,2)	17/13	(56,7/43,3)	85/55
DT* ( $\geq 37$ / $< 37$ )	30/80	(27,3/72,7)	8/22	(26,7/73,3)	38/102

\*DT – dob trudnoće u tjednima (ispitanici rođeni na termin  $\geq 37$  tjedana trudnoće; prijevremeno rođeni ispitanici  $< 37$  tjedana trudnoće)

Većina ispitanika skupine PM umrla je u neonatalnom razdoblju (78,6%) te je rođena prije vremena s manje od 37 tjedana trudnoće kako u podskupini neonatalno umrlih (72,7%) tako i u podskupini mrtvorodjenih (73,3%). U obje podskupine prevladavale su osobe muškog spola s nešto većom učestalošću u podskupini neonatalno umrlih (61,8%) (tablica 3).

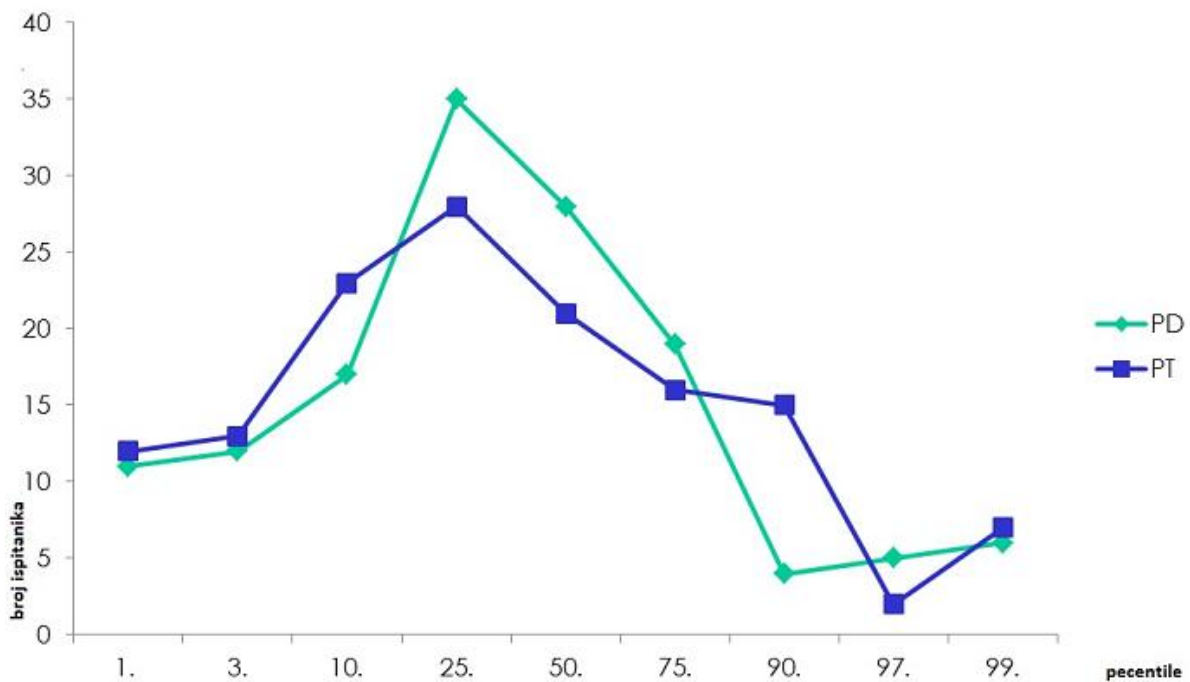
**Tablica 4.** Distribucija ispitanika PM skupine prema kronološkoj dobi

Ispitanci PM skupine		
Dob (h/d)*	(No)	(%)
0	30	21,4
≤1h	8	5,7
Od >1h do ≥24 h	45	32,2
>24 h do ≥7d	27	19,3
7 d – 28 d	30	21,4
<b>Ukupno</b>	<b>140</b>	<b>100</b>

\*h=sati; d=dani

Većina ispitanika PM skupine, njih 78,6% podleglo je smrti u perinatalnoj dobi zbog *major* anomalija dok je preostalih 21,4% mrtvorodeno. Perinatalna smrtnost u ovom istraživanju uključuje sve mrtvorodene nakon 28. tjedna trudnoće, kao i umrle u prvom tjednu života.

Iz medicinske dokumentacije za skupinu ispitanika PM podaci o porođajnoj težini (PT) i porođajnoj duljini (PD) bili su dostupni za 137 ispitanika, a temeljem kojih smo ih svrstali u 9 razreda prema njihovim pripadajućim percentilama (1., 3., 10., 25., 50., 75., 90., 97., 99. ) s obzirom na dob trudnoće i spol (slika 12).



**Slika 12.** Grafički prikaz distribucija ispitanika skupine PM prema porođajnoj duljini (PD) izraženoj u percentilima za dob trudnoće i spol i porođajnoj težini (PT) izraženoj u percentilima za dob trudnoće i spol.

Najveći broj ispitanika pripadao je 25. percentili kako prema PD tako i prema PT.

Od ukupno 140 ispitanika skupine PM, 20 (14,3%) je imalo jednu od najučestalijih kromosomskih aberacija, a preostalih 120 (85,7%) ispitanika imalo je jednu ili više malformacija. Nadalje, 120 ispitanika iz PM skupine nedokazane genetičke etiologije podijelili smo u dvije podskupine i to:

- podskupinu s izoliranim malformacijama u koju smo uključili 63 ispitanika i
- podskupinu s više malformacija u koju smo uključili 57 ispitanika (tablica 5).

**Tablica 5.** Distribucija ispitanika PM skupine prema kliničkim i/ili patoanatomskim nalazima malformacija/kromosomskih aberacija

Malformacije	Skupina PM (No) (%)	Neonatalno umrli (No) (%)	Mrtvorodeni No (%)
<b>Ukupno(%)</b>	<b>140 (100)</b>	<b>110 (78,6)</b>	<b>30 (21,4)</b>
<b>Kromosomske aberacije</b>	<b>20 (14,3)</b>	<b>16</b>	<b>4</b>
Trisomija 21	10	8	2
Trisomija 18	7	5	2
Trisomija 13	2	2	0
Ostali (duplikacija 7q)	1	1	0
<b>Nepoznate genetičke etilogije</b>	<b>120 (85,7)</b>	<b>94</b>	<b>26</b>
<b>Multiple malformacije</b>	<b>57</b>	<b>45</b>	<b>12</b>
<b>Izolirane malformacije</b>	<b>63</b>	<b>49</b>	<b>14</b>
PSG	14	12	2
Kraniofacijalne anomalije, SŽS i rascjepi neuralne cijevi	10	8	2
Anomalije GIS	15	12	3
AMS	16	10	6
*Ostale anomalije	8	7	1

PSG - prirođena srčana greška; SŽS - središnji živčani sustav; GIS - gastrointestinalni sustav; AMS - anomalije mokraćnog sustava \*Ostale anomalije uključuju: 3 bolesnika s gastoshizom + 4 bolesnika s malformacijama ekstremiteta + 1 bolesnik s cističnom adenomatoidnom malformacijom tipa 1.

Genotipizacija je provedena u 140 ispitanika PM skupine i 200 kontrolnih ispitanika. Distribucija svih ispitivanih genotipova u PM i kontrolnoj skupini podliježe HW ravnoteži, osim za rs9936833, gdje u skupini ispitanika odstupa od HW ravnoteže ( $p=4 \times 10^{-6}$ ).

Stvarna snaga studije potvrdila je očekivanu snagu od 80% uz sljedeće vrijednosti OR za svaki pojedinačni polimorfizam: rs10951154 OR=2,1; rs326119 OR=2,0; rs9936833 OR=1,9.

**Tablica 6.** Rezultati analize povezanosti frekvencija ispitivanih alela između PM i kontrolne skupine za navedene polimorfizme

Polimorfizam (Gen)	Ispitivani alel (IA)	Frekvencija IA PM skupina	Frekvencija IA kontrolne skupine	p*	OR (95% CI)
rs10951154 (HOXA1)	G	0,134	0,166	0,2603	0,76(0,47-1,20)
<b>rs12329305 (OSRI)</b>	<b>T</b>	<b>0,134</b>	<b>0,056</b>	<b><math>7 \times 10^{-4}</math></b>	<b>2,86(1,54-5,34)</b>
rs9936833 (blizu FOXF1)	C	0,434	0,385	0,2266	1,23(0,88-1,74)
rs326119 (MTRR)	C	0,587	0,518	0,1118	1,41(0,99-2,02)

IA - ispitivani alel; \*p-vrijednosti dobivene  $\chi^2$ - hi kvadrat testom; vrijednosti p su prilagođene uzimajući u obzir raspodjelu prema podrijetlu populacije (CEU),  $p < 0,0125$  smatrana je statistički značajna; OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI - interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

Analizirana je razlika frekvencija ispitivanih alela između PM i kontrolne skupine za četiri navedena polimorfizma. Utvrđena je razlika u frekvenciji ispitivanog alela (T) između PM i kontrolne skupine za polimorfizma rs12329305 gena *OSRI* ( $\chi^2=11,454$ ,  $p=7 \times 10^{-4}$ ) dok za ostala tri polimorfizma nije utvrđena razlika u frekvencijama ispitivanih alela između dvije skupine. OR za nastanak prirođenih malformacija je za 2,86 puta veća u djece s PM ukoliko postoji alel T za polimorfizma rs12329305 gena *OSRI*.

**Tablica 7.** Razlika u distribuciji genotipova četiri ispitivana polimorfizma između PM i kontrolne skupine

Gen Polimorfizam	Genotip	PM skupina No (%)	Kontrolna skupina No (%)	$\chi^2$	p
<i>HOXA1</i> rs10951154	AA	105 (78,3)	141 (70,9)	2,96	0,227
	AG	23 (17,2)	50 (25,1)		
	GG	6 (4,5)	8 (4,0)		
	Ukupno	134	199		
<i>OSR1</i> rs12329305	CC	93 (78,2)	174 (88,7)	<b>13,25</b>	<b>0,0013</b>
	CT	20 (16,8)	20 (11,3)		
	TT	6 (5,0)	0 (0,0)		
	Ukupno	119	194		
blizu <i>FOXF1</i> rs9936833	TT	26 (22,2)	67 (33,5)	5,15	0,076
	TC	80 (68,4)	112 (56)		
	CC	11 (9,4)	21 (10,5)		
	Ukupno	117	200		
<i>MTRR</i> rs326119	AA	17 (17,2)	49 (24,6)	4,048	0,130
	AC	49 (49,4)	103 (51,8)		
	CC	33 (33,3)	47 (23,6)		
	Ukupno	99	199		

$\chi^2$ -hi kvadrat test, p-vrijednost

Pokazana je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova za polimorfizam rs12329305 između PM i kontrolne skupine (p=0,0013). TT genotip prisutan je isključivo u PM skupini (6 ispitanika) dok nije nađen u kontrolnoj skupini.



**Table 8.** Rezultati analize povezanosti distribucije alela *OSRI* polimorfizma rs12329305 u podskupinama PM skupine, čija je podjela temeljena na kliničkim i/ili patoanatomskim nalazima malformacija/kromosomskih aberacija u odnosu na kontrolnu skupinu

Ispitanici	Ukupno No	Alel C <sup>†</sup>	Alel T	p*	OR (95% CI)
<b>Kontrolna skupina</b>	195	368	22		
<b>Skupina PM</b>	119	206	32	0,0007	2,86(1,54-5,34)
<b>Kromosomske aberacije</b>	16	25	7	<b>5x10<sup>-4</sup></b>	<b>2,03(0,71-5,59)</b>
<b>Multiple malformacije</b>	47	90	4	0,5927	0,18(0,05-0,58)
<b>Izolirane malformacije</b>	56	91	21	<b>1,25x10<sup>-5</sup></b>	<b>2,41(1,04-5,66)</b>
PSG	13	17	9	<b>5,12x10<sup>-8</sup></b>	<b>3,27(1,06-10,09)</b>
Kraniofacijalne anomalije, SŽS i rascjepi neuralne cijevi	8	15	1	0,254	0,25(0,01-2,03)
Anomalije GIS	14	26	2	0,7414	0,26(0,04-1,31)
AMS	16	24	8	<b>4,18x10<sup>-5</sup></b>	<b>1,72(0,57-5,16)</b>
Ostale anomalije*	5	9	1	0,5588	0,46(0,02-3,91)

\*p-vrijednosti dobivene  $\chi^2$ -hi kvadrat testom; OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*); CI - interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); †Referentni nivo; PSG - prirođena srčana greška; SŽS - središnji živčani sustav; GIS - gastrointestinalni sustav; AMS - anomalije mokraćnog sustava \*Ostale anomalije uključuju: 4 bolesnika s gastoshizom + 1 bolesnik s cističnom adenomatoidnom malformacijom tipa 1.

Analizirana je razlika u pojavnosti ispitivanog alela (T) polimorfizma rs12329305 gena *OSRI*, između specifičnih podskupina ispitanika s PM-om i kontrolne skupine. Utvrđena je značajna povezanost ispitivanog alela (T) s izoliranim anomalijama ( $\chi^2=19,092$ ;  $p=1,25 \times 10^{-5}$ ) i to s AMS ( $\chi^2=16,784$ ;  $p=4,18 \times 10^{-5}$ ) i PSG ( $\chi^2=29,671$ ;  $p=5,12 \times 10^{-8}$ ). U ispitanika s alelom T omjer izgleda za pojavu izoliranih anomalija 2,41 puta veći u odnosu na ispitanike s alela C. Pronađena je i razlika u distribuciji polimorfnog alela T u podskupini kromosomskih aberacija u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika uz rizik pojave iste malformacije za 2,03 puta ukoliko ispitanici imaju alel T u odnosu na alela C ( $\chi^2=12,178$ ;  $p=5 \times 10^{-4}$ ).

**Tablica 9.** Rezultati univarijantne logističke regresije u pojavnosti homozigota za češći alel prema heterozigotima i homozigotima za rjeđi alel između PM i kontrolne skupine za četiri ispitivana polimorfizma i spol

Gen	Genotip	Kontrolna skupina No(%)	PM skupina No(%)	p*	OR(95% CI)	p**
<i>HOXA1</i> rs10951154	AA † AG+GG	141 (71) 58 (29)	104 (78) 29 (22)	0,173	0,68(0,41-1,13)	0,137
<i>OSRI</i> rs12329305	CC † CT+TT	174 (89) 21 (11)	93 (78) 26 (22)	0,012	<b>2,3</b> (1,2-4,3)	<b>0,009</b>
<i>FOXF1</i> rs9936833	TT † TC+CC	67 (34) 133 (66)	26 (22) 91 (78)	0,045	<b>1,8</b> (1,0-2,9)	<b>0,034</b>
<i>MTRR</i> rs326119	AA † AG+GG	44 (22) 155 (78)	17 (17) 82 (83)	0,399	1,4(0,74-2,5)	0,321
SPO	Ž † M	102 (51) 98 (49)	55 (39) 85 (61)	0,043	<b>1,6</b> (1,04-2,5)	<b>0,033</b>

\*p-vrijednosti dobivene  $\chi^2$  testom; \*\*p-vrijednosti dobivene univarijantnom logističkom regresijom;

†Referentni nivo; M-muško; Ž-žensko

Nismo dokazali statistički značajne razlike distribucije ispitanika s homozigotnim genotipom za češći alel AA i ostalim genotipovima (AG+GG) u odnosu na istraživane skupine za *HOXA1* rs10951154 polimorfizam ( $\chi^2=1,86$ ; p=0,173).

U PM skupini bilo je za 2 puta više heterozigota i homozigota za rjeđi alel (CT+TT) za *OSRI* rs12329305 polimorfizam, nego u kontrolnoj skupini  $\chi^2=6,3$  p=0,012. OR za PM skupinu je 2,3 puta veći za genotipove CT+TT u odnosu na homozigote genotipa za češći alel (CC).

U kontrolnoj skupini je za 1,6 puta više homozigota za češći alel (TT) za *FOXF1* rs9936833 polimorfizma, u odnosu na ostale genotipove (TC+CC), dok je u PM skupini za 1,2 puta više ispitanika s ostalim (TC+CC) kombinacijama genotipova u odnosu na kontrolu  $\chi^2=4,0$  p=

0,045. OR je za 1,8 puta veći među ispitanicima s TC+CC genotipovima *FOXF1* rs9936833 polimorfizma za pojavu malformacija u odnosu na homozigote za češći alel (TT) p=0,034.

Nismo dokazali statistički značajne razlike distribucije ispitanika homozigotnog genotipa za češći alel (AA) i ostalih genotipova (AC+CC) u odnosu na istraživane skupine za polimorfizam rs326119, *MTRR* gena ( $\chi^2=0,71$ ; p=0,399).

OR za pojavnost prirođenih malformacija u skupini muškog spola za 1,6 puta veći nego u skupini ženskog spola (p=0,033).

**Tablica 10.** Rezultati multivarijantne logističke regresije u pojavnosti homozigota za češći alel prema heterozigotima i homozigotima za rjeđi alel između PM i kontrolne skupine za četiri ispitivana polimorfizma

Gen	Genotip	Kontrolna skupina No (%)	PM skupina No (%)	OR (95% CI)	p*
<i>HOXA1</i> rs10951154	AA † AG+GG	141 (71) 58 (29)	104 (78) 29 (22)	0,76(0,41-1,4)	0,397
<i>OSRI</i> rs12329305	CC † CT+TT	174 (89) 21 (11)	93 (78) 26 (22)	<b>2,0(0,96-4,2)</b>	<b>0,063</b>
<i>FOXF1</i> rs9936833	TT † TC+CC	67 (34) 133 (66)	26 (22) 91 (78)	<b>1,8(0,96 -3,5)</b>	<b>0,06</b>
<i>MTRR</i> rs326119	AA † AG+GG	44 (22) 155 (78)	17 (17) 82 (83)	1,5(0,75-3,1)	0,245

\*p-vrijednost dobivena multivarijantnom logističkom regresijom; † Referentni nivo

Multivarijantnom logističkom regresijom potvrdili smo da je OR 2 puta veći kod heterozigota i homozigota za rjeđi alel u skupini PM za polimorfne varijante rs12329305 i rs9936833 na razini značajnosti od 94%.

**Tablica 11.** Rezultati multivarijantne logističke regresije u pojavnosti homozigota za češći alel prema heterozigotima i homozigotima za rjeđi alel između PM i kontrolne skupine za četiri ispitivana polimorfizma usklađena za spol

Gen Polimorfizam	Genotip	Kontrolna skupina No (%)	PM skupina No (%)	OR (95% CI)	p*
<i>HOXA1</i> rs10951154	AA † AG+GG	141 (71) 58 (29)	104 (78) 29 (22)	0,76(0,4-1,4)	0,402
<i>OSRI</i> rs12329305	CC † CT+TT	174 (89) 21 (11)	93 (78) 26 (22)	1,9(0,91-4,0)	0,086
<i>FOXF1</i> rs9936833	TT † TC+CC	67 (34) 133 (66)	26 (22) 91 (78)	1,9(0,99 -3,6)	0,053
<i>MTRR</i> rs326119	AA † AG+GG	44 (22) 155 (78)	17 (17) 82 (83)	1,6(0,76-3,2)	0,220
SPOL	Ž † M	102 (51) 98 (49)	55 (39) 85 (61)	<b>1,8(1,0-3,2)</b>	<b>0,038</b>

\*p-vrijednost dobivena multivarijantnom logističkom regresijom; † Referentni nivo; M - muško; Ž - žensko

Multivarijantna logistička regresija s istovremenim utjecajem svih varijabli ispitivane skupine naspram kontrolnih ispitanika uz uključen spol pokazala je da je OR za pojavnost prirodnih malformacija u skupini muškog spola za 1,8 puta veći nego u skupini ženskog spola (p=0,038).

Nadalje prikazali smo povezanost raspodjele genotipova s određenim fenotipskim karakteristikama unutar ispitivane skupine.

**Tablica 12.** Rezultati multivarijantne logističke regresije distribucije genotipova četiri ispitivana polimorfizma uz uključen spol između skupine ispitanika sa prirođenim srčanim greškama (PSG) umrlim u fetalnom i neonatalnom razdoblju i ispitanika s ostalim malformacijama u istoj skupini

Gen Polimorfizam	Genotip	Ispitanici bez PSG No (%)	Ispitanici sa PSG No (%)	$\chi^2$	p *
<i>HOXA1</i> rs10951154	AA †	68 (76)	37 (84)	1,4	0,489
	AG	18 (20)	5 (11)		
	GG	4 (4)	2 (5)		
	Ukupno	90	44		
<i>OSRI</i> rs12329305	CC†	64 (80)	29 (75)	3,3	0,192
	CT	14 (18)	6 (15)		
	TT	2 (2)	4 (10)		
	Ukupno	80	39		
blizu <i>FOXF1</i> rs9936833	TT†	16 (20,0)	10 (26,0)	0,724	0,696
	TC	56 (71,0)	24 (63,0)		
	CC	7 (9)	4 (11)		
	Ukupno	79	38		
<i>MTRR</i> rs326119	AA†	12 (18)	5 (16)	0,085	0,958
	AC	33 (48)	16 (52)		
	CC	23 (34)	10 (32)		
	Ukupno	68	31		
SPOL	Ž†	32 (34)	23 (51)	<b>3,2</b>	<b>0,074</b>
	M	63 (66)	22 (49)		
	Ukupno	95	45		

\*p-vrijednost dobivena multivarijantnom logističkom regresijom; †Referentni nivo; M - muško; Ž - žensko

U skupini ispitanika sa PSG-om za 1,5 puta više je ispitanika ženskog spola nego u ispitanika s ostalim malformacijama na razini značajnosti od 93% ( $\chi^2=3,2$ ;  $p=0,074$ ).

**Tablica 13.** Rezultati multivarijantne logističke regresije distribucije genotipova četiri ispitivana polimorfizma uz uključen spol između skupine ispitanika s anomalijama mokraćnog sustava (AMS) umrlih u fetalnom i neonatalnom razdoblju i ispitanika s ostalim malformacijama u istoj skupini

Gen Polimorfizam	Genotip	Ispitanici bez AMS No (%)	Ispitanici sa AMS No (%)	$\chi^2$	p *
<i>HOXA1</i>					
rs10951154	AA†	62 (77)	43 (80)	0,517	0,772
	AG	15 (19)	8 (15)		
	GG	3 (4)	3 (5)		
	Ukupno	80	54		
<i>OSRI</i>					
rs12329305	CC†	53 (74)	40 (85)	2,3	0,311
	CT	15 (21)	5 (11)		
	TT	4 (2)	2 (4)		
	Ukupno	72	47		
blizu <i>FOXF1</i>					
rs9936833	TT†	17 (23)	9 (26,0)	4,7	0,094
	TC	46 (63)	34 (63,0)		
	CC	10 (14)	1 (11)		
	Ukupno	73	44		
<i>MTRR</i>					
rs326119	AA†	9 (18)	8 (22)	1,0	0,597
	AC	32 (48)	17 (47)		
	CC	22 (34)	11 (31)		
	Ukupno	63	36		
SPOL	Ž†	39 (47)	16 (28)	<b>4,3</b>	<b>0,038</b>
	M	44 (53)	41 (72)		
	Ukupno	83	57		

\*p vrijednost dobivena multivarijantnom logističkom regresijom; †Referentni nivo; AMS - anomalije mokraćnog sustava;  $\chi^2$  - hi kvadrat test; M - muško; Ž - žensko

U skupini ispitanika s ostalim malformacijama je za 1,7 puta više ispitanika ženskog spola nego u skupini s AMS -om, a u skupini s AMS-om je za 1,4 puta više ispitanika muškog spola nego u skupini s ostalim malformacijama na razini značajnosti od 91% ( $\chi^2=4,3$ ; p=0,038).

Metodama logističke regresije nisu dobivene statističke značajne razlike unutar ispitivane skupine PM:

- između dobi trudnoće mrtvorodenih i živorođenih;
- između kronološke dobi ispitanika (perinatalna dob/neonatalna dob);
- između PT i PD ispitanika s obzirom na specifični tip prirođene malformacije/a.

Podaci stoga nisu prikazani.

Budući da smo isključivo u skupini ispitanika PM pronašli ispitanike homozigotnog genotipa TT polimorfizma rs12329305 gena *OSRI* i to s izoliranim malformacijama srca i mokraćnog sustava po nalazu patološkoanatomske dijagnoze, analizirali smo specifične fenotipske osobitosti ispitanika.

**Tablica 14.** Fenotipske karakteristike u šest ispitanika s homozigotnim genotipom za rjeđi alel T za polimorfizam rs12329305 gena *OSRI* prema patološkoanatomskoj dijagnozi (PAD)

PAD	Spol/DT	Dob (h)*	PT(g)/perc.	PD(cm)/perc.
Obliteriran DB	Ž/40	0	3480/50	52/75
Obliteriran DB	M/34	0	1960/25	42/10
HLHS	Ž/38,5	36	2580/10	48/10
HLHS	Ž/33	60	1760/25	42/25
Unilateralna ageneza bubrega	Ž/28	0	650/3	34/25
Unilateralna ureterohidronefoza	M/40	11,7	3030/10	51/50

\*h=sati; PAD - patološkoanatomska dijagnoza; DT - dob trudnoće u tjednima; DB - Ductus Bottali; HLHS - sindrom hipoplastičnog lijevog srca (engl. *Hypoplastic left heart syndrome*) PT - porođajna težina izražena u gramima (g), PD - porođajna duljina izražena u centimetrima (cm); perc. - percentile određene za dob trudnoće i spol; M - muško; Ž - žensko

Među spomenutim TT homozigotima za rjeđi alel nema jedinstvenog fenotipa. Prijevremeno zatvaranje (obliteracija) Ductus Bottali (DB) nalazimo isključivo u mrtvorodenih dok ostale PAD možemo naći od mrtvorodene do kasne životne dobi.

## 5. RASPRAVA

U studiji je po prvi put istraživana povezanost četiri polimorfizma gena i to rs12329305 *OSRI*, rs10951154 *HOXA1*, rs9936833 u blizini *FOXF1* i rs326119 *MTRR* s razvojem prirođenih anomalija u perinatalno i neonatalno umrle djece.

Studija je temeljena na hipotezi da predočeni kandidatni polimorfizmi tijekom embriskog razvoja čine čimbenike rizika za nastanak različitih tipova PA jednog ili više organa, uglavnom od velikog kliničkog značenja tzv. *major* anomalija povezanih s letalnim ishodom.

Selekcija naših kandidatnih polimorfizama u spomenutim genima temeljila se na njihovoj pretpostavljenoj funkcionalnosti tijekom embriogeneze čovjeka.

Nekoliko je velikih studija nedavno dalo novi uvid u ključnu ulogu gena u pojedinim embrijskim fazama razvoja srca i bubrega (25,26). Mutacije u genima, uključenim u razvoj čovjeka, posljedično uzrokuju odstupanje od normalnog razvojnog procesa u prenatalnom razdoblju i u većini slučajeva postnatalno se očituju plejotropnim fenotipskim učinkom, poput izoliranih ili multiplih malformacija. Pregledom dosadašnjih istraživanja izabrali smo polimorfizme tri gena (*OSRI*, *HOXA1* i *FOXF1*) koji kodiraju istoimene proteine s funkcijom transkripcijskih čimbenika i jedan polimorfizam gena metaboličkog enzima (*MTRR*) koji je uključen u vrlo važan folatni metabolizam tijekom embrijskog razvoja, a sva četiri polimorfizma utječu na ekspresiju jednog ili više gena tijekom humane embriogeneze (18,31,42,49,65). Polimorfizmi spomenutih gena do sada nisu istraživani u perinatalno i neonatalno umrle djece zbog različitih tipova PA. Neki od njih istraživani su u studijama povezanosti sa specifičnom razvojnom anomalijom pojedinog organa i organskih sustava u različitim populacijama, ali nikada s aspekta njihova mogućeg plejotropnog učinka na fenotip (36,42,49,65).

U istraživanje je bio uključen dio ispitanika s trisomijom kromosoma 7q, 13, 18, i 21, stoga smo pazili da istraživani polimorfizmi budu mapirani na kromosomima (2, 5, 7p i 16) koji se ne preklapaju sa spomenutim kromosopatijama da bi smo izbjegli greške u genotipizaciji.

Sva četiri istraživana polimorfizma direktno ili indirektno utječu na ekspresiju gena uključenih u razvoj pa smo pretpostavili da imaju i važnu ulogu u patogenezi PM-a, a posebno onih od velikog kliničkog značenja, tzv. *major* anomalije.



Dva polimorfizma rs10951154 gena *HOXA1* i rs12329305 gena *OSRI* već su od prije poznati po direktnom utjecaju na svoje kodirajuće proteine zbog položaja unutar kodirajućih područja gena (egzonima) (31,42). Budući da njihovi proteini imaju funkciju transkripcijskih čimbenika pretpostavili smo da i spomenuti polimorfizmi mogu utjecati na regulaciju ekspresije jednog ili više gena tijekom humane embriogeneze i doprinijeti povećanom riziku nastanka PA (27,31,42). Sljedeća dva polimorfizma mapirana su u nekodirajućim područjima, rs9936833 u intergenskom području DNA u blizini gena *FOXF1*, a polimorfizam rs326119 smješten je u intronskom području gena *MTRR* (49,65). Iako se fenotipski učinak dva posljednja polimorfizma teško procjenjuje poznato je da takvi polimorfizmi mogu ometati koordiniranu gensku ekspresiju, stoga smo pretpostavili da bi mogli biti čimbenici rizika u nastanku PM-a (74).

Ova studija je uključila 140 ispitanika s PM-ama i kontrolnu skupinu od 200 zdrave djece. S obzirom na predočene biološke osobitosti spomenutih polimorfizama učinjeno je i uzorkovanje naših ispitanika po klasifikaciji Merksa i sur. (81). Svi ispitanici skupine PM imali su jednu ili više PA od velikog kliničkog značenja tzv. *major* anomalije i to pretpostavljenog letalnog tipa, a s druge strane kontrolnu skupinu ispitanika činila su zdrava djeca bez PM-a. Stoga smo odabirom ispitanika iz dvije fenotipske krajnosti pojačali i statističku snagu naše studije (83).

Analiza kvalitete distribucije genotipova u skupini PM i kontrolnoj skupini za sva četiri ispitana polimorfizma pokazala je da su u skladu s HW ravnotežom, izuzev rs9936833 koji je pokazao odstupanje od HW ravnoteže samo u skupini ispitanika s PM -om, što nam je ukazalo na moguću povezanost istraživanog polimorfizma s ispitivanim fenotipom, a što je u našem istraživanju potvrđeno (91).

Najvažniji rezultat ove studije je alelska i genotipska povezanost polimorfizma **rs12329305 gena *OSRI*** s razvojnim anomalijama, a posebno s izoliranim malformacijama srca i bubrega.

Istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u distribuciji T alela za polimorfizam gena rs12329305 *OSRI* u skupini djece s PM-ama u odnosu na kontrolnu skupinu djece ( $p=7 \times 10^{-4}$ ). Kod postojanja T alela rizik za razvoj malformacija je povećan za 2,86 puta. Pronađena je razlika u distribuciji polimorfnog alela T istog polimorfizma po specifičnim podskupinama PM sa značajnim razlikama u podskupini izoliranih malformacija u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika ( $p=1.25 \times 10^{-5}$ ) što povećava rizik pojave izolirane anomalije za 2,41 puta. Nadalje, s obzirom na specifičnu kategoriju malformacije

polimorfni alel T bio je najzastupljeniji u ispitanika s PSG -om i AMS -om što povećava rizik za navedenu anomaliju za 3,27 odnosno 1,72 puta. Temeljem istraživanja mutacija gena *Osr1* na mišjem modelu zaključili smo da bi ova polimorfna varijanta mogla doprinijeti podložnosti nastanka razvojnih anomalija srca i mokraćnog sustava tijekom ranog embrijskog razvoja i u čovjeka, a moguće je da su mutacije ovog gena letalne u ranoj fazi embrijskog razvoja (38).

Dokazana je i statistički značajna razlika u distribuciji genotipova za polimorfizam rs12329305, gena *OSRI* između skupine PM i kontrolne skupine ( $p=0,0013$ ). Dokazali smo da je polimorfizam rs12329305, genotipova CT i TT, gena *OSRI* dva puta češće prisutan u skupini PM (22%) nego u skupini zdravih kontrolnih ispitanika (11%) ( $p=0,012$ ) uz povećani rizik ( $OR=2,3$ ) razvoja prirođene malformacije. Homozigote za rjeđi alel genotipa TT pronašli smo isključivo u skupini ispitanika s PM-om dok nije nađen u kontrolnoj skupini. U istraživanju Zhanga i sur., koje je provedeno na zdravoj djeci, nisu nađeni homozigoti (TT) za rjeđi alel T, dok smo mi u našoj studiji u skupini PM imali šest ispitanika s homozigotnim TT genotipom, što sugerira funkcionalnost ove rijetke varijante i ukazuje na mogući klinički fenotip u humanoj patologiji (42). U istoj studiji provedenoj u Montrealu analizirani su uzorci bijelaca (176 zdrave novorođenčadi) te je pokazana značajno veća učestalost polimorfnog alela T polimorfizma rs12329305 gena *OSRI* u skupini djece s manjim volumenom bubrega i povećanom koncentracijom cistatina C (42).

Prema istraživanju literature do sada nije pronađena mutacija u humanom genu *OSRI*, a koja se povezuje s klinički prepoznatljivim modelom anomalija (sindromom). TT homozigoti u ovom istraživanju pronađeni su isključivo u podskupini izoliranih anomalija i to u ispitanika sa PSG-om i AMS-om stoga smo isključili povezanost ovih homozigota sa sindromom. S kliničkog aspekta zanimalo nas je nalazi li se genotip TT homozigota u fenotipu spomenutih anomalija u dojenčadi i kasnijoj životnoj dobi. Uvidom u nalaze patoanatomske obdukcije fenotipovi svih anomalija imali su vrlo varijabilnu kliničku ekspresiju od letalne do klinički neprepoznate. Među letalnim oblicima prirođenih malformacija, a koju ne nalazimo u kasnijoj životnoj dobi, jest i prijevremeno zatvaranje (obliteracija) *Ductus Bottali* (DB). DB ili arterijski kanal je važna krvna žila koja omogućuje protok krvi između plućne arterije i aorte tijekom fetalnog života. Nakon rođenja prelaskom na adultni obrazac cirkulacije nastaje spontano zatvaranje DB-a (92). Prijevremeno zatvaranje DB-a je vrlo rijetka pojava ukoliko se pojavi *in utero* uzrokuje letalnu respiratornu insuficijenciju, a pronađen je u fetalnog hidropsa dok neposredno nakon porođaja kao izolirana malformacija može uzrokovati letalnu respiratornu insuficijenciju ako se ne

prepozna na vrijeme (93). Stoga bi genotipiziranje polimorfizma rs12329305 gena *OSR1* bilo od velike koristi provesti među ispitanicima s kliničkom dijagnozom fetalnog hidropsa, a koje smo mi isključili iz ovog istraživanja zbog toga što nisu zadovoljavali kriterije po Merksu i sur. (81).

U provedenoj studiji pokazano je da je učestalost alela T polimorfizma rs12329305 gena *OSR1* u uzroku od 200 ispitanika kontrolne skupine hrvatske populacije 5,6%, što je sukladno rezultatima učestalosti alela T u studiji provedenoj u zdrave novorođenčadi bijelaca u Americi (6%) (42). U našoj kontrolnoj skupini ispitanika nismo našli homozigote za rjeđi T alel što je sukladno nalazima iz dostupne baze podataka NCBI dbSNP, u kojima također nisu pronađeni homozigoti za rjeđi alel, a frekvencija rjeđeg alela za CEU populaciju iznosi 2,2%. U skladu s tim, rs12329305 polimorfizam niske frekvencije, pokazao je veliki učinak za nastanak prirođenih malformacija u djece umrle u fetalnom i neonatalnom razdoblju, a posebno u djece s izoliranim malformacija srca i bubrega. Polimorfne varijante s MAF-ovima između 0,1% i 3% definiraju se kao rijetke varijante, a pojedina istraživanja su pokazala da ukoliko su povezane sa složenim fenotipom ponekad imaju veći učinak na fenotip od učestalih varijanti (84).

Polimorfizam rs12329305 gena *OSR1* nalazi se u kodirajućem području (egzon 2), a zamjena alela T za C uzrokuje promjenu sekundarne strukture njegove mRNA. Promijenjena sekundarna struktura mRNA najvjerojatnije utječe na njenu tercijarnu strukturu, koja je nestabilna pa se posljedično smanjuje aktivnost i proteinskog produkta, a za kojeg je poznato da ima ulogu transkripcijskog čimbenika (42). Pokazalo se da SNP-ovi koje se nalaze u kodirajućem području i za koje se predviđa da oštećuju strukturu proteina imaju vjerojatno funkcionalni efekt na fenotipu (94,95).

Na mišjem modelu dokazano je da gen *Osr1* ima ključnu ulogu u ranim fazama razvoja bubrega i srca (38). Istraživanja su pokazala da su *Osr1* protein i njegov homolog *Osr2* protein funkcionalno ekvivalentni u razvoju miša. *Osr2* protein postoji u dvije izoforme: *Osr2B* i sadržava tri i *Osr2A* i sadržava pet domena cinkovih prstiju (DNA-vežuće domene), *Osr2A* protein potiskuje, dok *Osr2B* aktivira transkripciju aktivnost gena (96,97). Kod miševa *Osr1* protein je strukturni homolog *Osr2B* proteinu, dijele 65% sličnosti u slijedu aminokiselina, a 98% su identični u aminokiselinskim sekvencijama u konzerviranom području njihovih domena cinkovih prstiju (98). Pretpostavlja se da je njihova strukturna homologija i djelomična sličnost važan biološki mehanizam u embrijskom razvoju i organogenezi čovjeka, kao i u razvoja miša (98). Na mišjem modelu dokazano je da je *Osr1* protein komponenta signalnog puta u regulaciji embrijskog kardiovaskularnog razvoja. On

fosforila i regulira funkciju mnogih čimbenika angiogeneze i njihovih receptora. S druge strane, neki slučajevi sa smanjenim stvaranjem ili smanjenom bioraspoloživosti transkripcijskoj regulatornog *Osr1* proteina izbjegnu kardiovaskularnu malformaciju zbog ostatne aktivnosti kinaza drugih čimbenika uključenih u kaskadu *Osr1* signalnog puta (99).

Naša studija nije pokazala statistički značajnu razliku u alelskoj distribuciji za polimorfizam **rs9936833 u blizini gena *FOXF1*** u skupini djece s PM-om u odnosu na kontrolnu skupinu djece. Univarijantnom logističkom regresijskom analizom nađena je statistički značajna genotipska povezanost ispitivanog polimorfizma s PM-om. U toj analizi smo sve ispitanike iz obje skupine (skupinu PM i kontrolnu skupinu) prema genotipu podijelili u dvije skupine na temeljem prisutnosti ili odsutnosti ispitivanog polimorfno alela C u genotipu. U prvu grupu skupinu uključili smo dva genotipa: heterozigote (TC)+ homozigote za rjeđi alel (CC), a u drugu homozigote za češći alel (TT) i dokazali da je polimorfizam rs9936833, genotipova TC+CC odnosno onih u kojima je prisutan polimorfni alel C statistički značajno češće prisutan u skupini PM (78%) nego u skupini zdravih kontrolnih ispitanika (66%) za polimorfizam rs9936833 u blizini gena *FOXF1*.

S obzirom na potvrđenu genotipsku povezanost polimorfizma rs9936833 gena *FOXF1* s prirođenim malformacijama i veću učestalost genotipova TC+CC u skupini ispitanika s PM-om, a manju učestalost TT genotipa, univarijantnom logističkom regresijskom analizom izračunali smo koliki je OR za pojavu PM. Dobili smo da je za 1,8 puta veća mogućnost razvoja PA u ispitanika s genotipovima (TC+CC) u odnosu na homozigote za češći alel (TT) bez polimorfno alela C. Stoga rezultati naše studije upućuju na njegovu umiješanost kao čimbenika rizika u razvojne poremećaje u perinatalno i neonatalno umrlih bolesnika. Pravi utjecaj ovih genotipova polimorfizma rs9936833 moći će se objasniti nakon provedene funkcionalne studije.

Polimorfizam rs9936833 odabrali smo za naše istraživanje temeljem povezanosti njegove lokus pozicije na 16q24.1 i određene anomalije (49). On se nalazi u nekodirajućem, intergenskom području DNA u blizini gena *FOXF1* (16q24), a u istoj studiji polimorfni alel C polimorfizma rs9936833 pokazao se kao čimbenik rizika za fenotip Barretova jednjaka stoga nam je ista studija ukazala na njegovu umiješanost u embrijski razvoj i strukturu jednjaka (49). Većina polimorfizama mapiranih u nekodirajućim intergenskim područjima DNA utječe na ekspresiju gena modulirajući regulatorne elemente promotorskog područja (*cis*-djelujuća područja) i tako ometaju koordiniranu gensku ekspresiju (74). Polimorfizam rs9936833 sadržava više DNA-vežućih mjesta za određene transkripcijske čimbenike kao što je *FOXP2*,

a koji kontrolira ekspresiju gena od našeg interesa, *FOXF1* (49). Gen *FOXF1* transkripcijskom aktivnošću modulira ekspresiju gena specifičnih tkiva (npr. pluća i crijeva), a kad je neaktivan uzrokuje promjene u strukturi jednjaka, posebno njegovu atreziju (45,46,100). *FOXF1* proteini su transkripcijski čimbenici esencijalni u organogenezi pluća i gastrointestinalnog sustava (44,47,101). Studije Shaw-Smitha, Yua i sur. te studija Sena i sur. pokazale su da su heterozigotne mutacije u genu *FOXF1* većinom smještene unutar potencijalno DNA-vežuće domene u bolesnika s letalnim razvojnim anomalijama pluća (ACD/MPV) (48,101,102). Uvijek su udružene s multiplim malformacijama srca, gastrointestinalnog i mokraćnog sustava, sličnim onima koji se nađu u VACTERL asocijaciji, dok istraživanja Agochukwua i sur. to nisu potvrdila (103).

U našoj studiji za polimorfizam **rs10951154** gena *HOXA1* nije utvrđena statistički značajna razlika ni u alelskoj ni u genotipskoj distribuciji između PM i kontrolne skupine. Moguće objašnjenje nedokazane povezanosti je raznolikost PM u skupini ispitanika, a koja je uključila tzv. *major* anomalije letalnog karaktera gotovo svih organskih sustava, a među njima su prevladavale anomalije kardiovaskularnog i mokraćnog sustava, bilo izolirane bilo udružene s anomalijama drugih organskih sustava. To potvrđuje i negativan rezultat studije Liua i sur. provedene u kineskoj populaciji bolesnika s ventrikularnim septalnim defektom (VSD) koji su sekvencioniranjem gena *HOXA1* pronašli i druge varijante u egzonu 1, koje mijenjaju seriju od 10 histidinskih ponavljanja na različitim pozicijama proteinskog proizvoda od 65 do 74 aminokiseline, ali nesignifikantnog kliničkog značenja (36).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je polimorfizam rs10951154 gena *HOXA1* povezan sa spektrom autističkih poremećaja i razvojem moždanog debla (31). Concatori i sur. u svojoj studiji pokazali su da ovaj polimorfizam modulira opseg glave u djece sa spektrom autističkih poremećaja (32). U svojoj studiji Raznahan i sur. varijantu A218G povezuju s mogućom ulogom genetskog modulatora uključenu u razvoj cerebelarnog sustava, a koji je upleten u neurobiologiju spektra autističkog poremećaja (35).

Za polimorfizam **rs326119** gena *MTRR* naše istraživanje analize povezanosti nije pokazalo ni alelsku ni genotipsku povezanost s PA. Nismo dokazali ni statistički značajne razlike distribucije ispitanika s obzirom na prisutnost polimorfnog alela C u njihovim genotipovima (AC+CC), naspram genotipa AA u istraživanim skupinama (skupina PM i kontrolna skupina). Studija Zhaoa i sur. koja je uključila 2340 bolesnika sa PSG-om pokazala je da je funkcionalni polimorfizam rs326119 gena *MTRR*, učestaliji u bolesnika u odnosu na

kontrolnu skupinu (2270 zdravih ispitanika) u kineskoj populaciji dok istraživanja u drugim populacijama nisu provedena (65). Spomenuta studija je dodatnim istraživanjem pokazala da ovaj polimorfizam po karakteristikama intronski, vjerojatno smanjuje ekspresiju gena *MTRR* jer je poremećena regulacija transkripcijske aktivnosti, što rezultira akumulacijom homocisteina u plazmi. Njihovi rezultati ujedno sugeriraju da su embriji s homozigotnim genotipom CC polimorfizma rs326119 gena *MTRR* osjetljiviji na moguće prehrabene deficite, osobito nedostatke metionina i 5-metiltetrahidrofolata. Stoga spomenuta studija zaključuje da postojanje rs326119 polimorfizma u fetusa povećava strogu sklonost k hipometioninemiji i hiperhomocisteinemiji (65).

Kad se genotipizacijom dokaže da je fetus osjetljiviji na majčin nedostatak folne kiseline odnosno da ima polimorfizam rs326119 gena *MTRR* potrebno je u trudnica primijeniti preventivne mjere nadoknade folne kiseline vitamina B12 i B6 perikonceptijski i u prvom tromjesečju (tijekom embrijskog razdoblja razvoja srca) (65).

Negativni rezultati naše studije za ovaj funkcionalni polimorfizam rs326119 mogu se objasniti i djelomičnim ograničenjima u našem istraživanju, a odnose se na neuspješnost genotipiziranja kod ovog polimorfizma od 12,3%, a koja je bila gotovo isključivo u uzorcima DNA dobivene iz arhiviranog tkiva u ispitanika s PM-om, ali ne i u kontrolnoj skupini. Poznato je da formalin smanjuje učinak PCR reakcije zbog degradacije DNA pa samo kratke sekvencije mogu imati visoku uspješnost genotipiziranja (89,90). Ovaj polimorfizam je ostavljen u analizi povezanosti jer je ispunio ostale provjere kvalitete, a odnosi se na MAF i HW ravnotežu. Drugo ograničenje ove studije je veličina uzorka i selekcija ispitanika. Dio ispitanika je isključen zbog neuspješnosti genotipiziranja pa je manji i uzorak ispitanika s PM-om. S druge strane, među našim ispitanicima bilo je ponajviše ispitanika sa PSG -om (bilo izoliranih bilo povezanih s drugim anomalijama). Te anomalije su bile letalnog karaktera, a spomenuta studija je provela istraživanje u bolesnika isključivo s VSD-om, izoliranim PSG-om koji nema značajniji utjecaj na perinatalni mortalitet (65).

Od ukupno 140 ispitanika PM skupine, njih 20 (14,3%) imalo je jednu od najučestalijih kromosomskih aberacija. U našoj analizi povezanosti po podskupinama PM-a pronađena je razlika u distribuciji polimorfnog alela T za polimorfizam rs12329305 gena *OSRI* sa značajnim razlikama u podskupini kromosomskih aberacija ( $p=5 \times 10^{-4}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika. Kod ispitanika s alelom T rizik za pojave kromosomske aberacije je povećan za 2,03 puta u odnosu na ispitanike s alelom C. S obzirom na mali

uzorak ispitanika možemo jedino spekulirati o mogućoj uključenosti rs12329305 polimorfizma u regulaciju razvojnih puteva u ispitanika za kojeg znamo da ima neuravnoteženi genom (tri kopije gena kromosoma 21 ili kromosoma 18) i u tim slučajevima moguće pojačava fenotipsku ekspresiju. Ulogu ovog polimorfizma kao genskog modulatora (pojačivača) za nastanak specifičnih malformacija u poznatim kromosomskim poremećajima trebalo bi istražiti u budućim studijama s većim brojem ispitanika.

U našoj studiji u skupini ispitanika s PM-om prevladavali su ispitanici muškog spola 61% (85), dok je 39% (55) bilo ženskog spola. Osvrnuli smo se na neujednačenost između istraživanih skupina po spolu i objasnili već odavno poznatom činjenicom da se PA i do 30% češće pojavljuju u djece muškog spola (7,8). Naši rezultati dobiveni metodom multivarijantne logističke regresije, s obzirom na pojavnosti ispitivanog polimorfog alela u genotipu (homozigoti za rjeđi alel + heterozigoti) naspram njegove odsutnosti u genotipu (homozigoti za češći alel) između PM i kontrolne skupine uz uključen spol za četiri ispitivana polimorfizma, pokazali su da je OR za pojavnost PM-a u skupini muškog spola za 1,8 puta veći nego u skupini ženskog spola ( $p=0,038$ ).

Kochanek i sur. u svojem istraživanju navode da od svih perinatalno umrlih 25-30% su posljedica teških strukturnih PA različitih organa (10). U našoj strogo selektivnoj skupini ispitanika s PM-om većina ih je umrla u neonatalnom razdoblju (78,6%), a ovaj se podatak ne odnosi na sve perinatalno umrle kao u gore spomenutom istraživanju Kochaneka i sur. (10). Iz medicinske dokumentacije za skupinu ispitanika PM podaci o porođajnoj težini (PT) i porođajnoj duljini (PD) bili su dostupni za 137 ispitanika. Ispitanike smo prema njihovim PT-a i PD-a s obzirom na dob trudnoće i spol svrstali u razrede prema njihovim pripadajućim percentilama koristeći krivulje rasta prema Olsenu i sur. (104). Većina ispitanika s PM-om (72,7%) je prijevremeno rođena s nižom PT i PD (25. percentila) što se slaže s podacima istraživanja drugih studija da djeca s PM-om imaju veću vjerojatnost da se prijevremeno rode (nedonoščad) i veću vjerojatnost da budu niske PT (nedostaščad), a koji su dodatni čimbenici rizika perinatalne smrti (11,12).

Unutar istraživane PM skupine zanimalo nas je postoji li razlika u distribuciji genotipova za četiri istraživana polimorfizma uz uključen spol između ispitanika sa specifičnim razvojnim poremećajem određenog organa, a naspram ostalih ispitanika koji uključuju ispitanike sa svim ostalim anomalijama unutar istraživane skupine metodom multivarijantne logističke regresije. Analiza je provedena u ispitanika s najučestalijim PM-

ima, odnosno sa PSG -om (uključila je sve ispitanike s izoliranim PSG-om uz ispitanike koji su uz PSG imali i pridruženu anomaliju/e drugih organskih sustava) i s AMS-om (uključila je sve ispitanike s izoliranim AMS-om uz ispitanike koji su uz AMS imali i pridruženu anomaliju/e drugih organskih sustava). Ovom analizom niti jedan genotip od četiri istraživana polimorfizma nije bio povezan ni sa PSG-om ni AMS-om. Međutim rezultati analize su pokazali da je pojava PSG-a za 1,5 puta češća u ispitanika ženskog spola nego u ispitanika s ostalim malformacijama na razini značajnosti 93% ( $p=0,074$ ) dok je AMS za 1,4 puta češći u muškog spola na razini značajnosti od 91% ( $p=0,038$ ).

Poznato je da se specifičnost PA povezuje s povećanim perinatalnim morbiditetom i mortalitetom (12). U odnosu na incidenciju PSG-a poznato je da se pojedini tipovi PSG-a češće pojavljuju u muškog spola kao što su transpozicija velikih arterija i opstruktivne greške izlaznog trakta lijeve klijetke dok su defekt atrijskog septuma i Ebsteinova anomalija češći u ženskog spola (105,106). Slična zapažanja odnose se i na AMS i naši rezultati su u skladu s rezultatima drugih studija. Alicelebić i sur. u svom istraživanju pronašli su da su anomalije mokraćnog sustava u Bosni i Hercegovini bile češće u muških nego u ženskih ispitanika (62,37%) dok su Czichos i sur. u svom istraživanju na obdukcijama fetusa i novorođenčadi našli da su opstruktivne uropatije i ageneze bubrega češće u muških fetusa i novorođenčadi (107,108).

Ova studija po prvi put povezuje polimorfizme rs12329305 gena *OSRI* i rs9936833 gena *FOXF1* kao čimbenike rizika u pojavi različitih tipova PM-a u perinatalno i neonatalno umrle djece. Polimorfizam rs12329305 gena *OSRI* pokazao se kao čimbenik rizika u razvoju specifičnog tipu izoliranih anomalija i to PSG-a i AMS-a u istoj skupini djece. Ovi rezultati mogu biti iznimno korisni zbog velike učestalosti PA, a koje su se pokazale kao vodeći uzrok smrti u perinatalnom mortalitetu razvijenih zemalja kao i visoke učestalosti i širokog kliničkog spektra PSG-a i AMS-a, a koje čine i značajan dio morbiditeta u svim populacijama. Stoga bi bilo od koristi ovo istraživanje provesti na specifičnom i većem uzorku ispitanika radi potvrde naših nalaza. U cilju rasvjetljenja djelovanja rs12329305 polimorfizma gena *OSRI* kao potencijalnog genetskog modulatora u nastanku specifične malformacije u već poznatim kromosopatijama trebalo bi isto istražiti u budućim studijama također s većim brojem ispitanika.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Dokazali smo povezanost pojavnosti rjeđeg alela (T) polimorfizma rs12329305 gena *OSRI* s pojavom prirođenih malformacija jednog ili više organa.  
Polimorfizmi rs12329305 gena *OSRI* i rs9936833 gena *FOXF1* također su pokazali genotipsku povezanost s nastankom prirođenih malformacija.  
Pojavnost rjeđeg alela (T) polimorfizma rs12329305 gena *OSRI* povezana je sa specifičnim tipom prirodene malformacije i to malformacijama srca i bubrega u djece umrlih u perinatalnom i neonatalnom razdoblju.
2. U skupini djece s prirođenim malformacijama bilo je značajno više muške djece. Analiza genotipske distribucije četiri ispitivana polimorfizma uz uključenu varijablu spola pokazala je također veću pojavnost prirođenih malformacija u skupini muškog spola u odnosu na ženski.
3. Homozigotni genotip za rjeđi alel (TT) polimorfizma rs12329305 gena *OSRI* kojeg smo pronašli u fenotipu prijevremenog zatvaranja (obliteracije, atrezije) Ductus Bottali je ujedno i etiološki uzrok smrti, *in utero* letalne respiratorne insuficijencije, istih ispitanika.

## 7. SAŽETAK

U ovom istraživanju proveli smo genetičku studiju povezanosti različitih tipova prirođenih anomalija s polimorfizmima gena uključenih u razvoj kao čimbenika rizika razvojnih poremećaja.

Analizirali smo 140 uzoraka DNA izolirane iz tkiva parafinskih kocki od fetalno ili neonatalno umrle djece s prirođenim anomalijama a naspram kontrolne skupine zdrave djece kod četiri različita polimorfizma gena rs12329305 *OSRI*, rs10951154 *HOXA1*, rs9936833 u blizini *FOXF1* i rs326119 *MTRR*. Spomenuti polimorfizmi analizirani su metodom *real-time* PCR. Analiza povezanosti napravljena je na razini alelske i genotipske distribucije između dvije ispitivane skupine.

Značajnu alelsku ( $p=7\times 10^{-4}$ ) i genotipsku ( $p=0,0013$ ) povezanost s prirođenim malformacijama našli smo u polimorfizmu rs12329305 gena *OSRI*. Dodatne analize povezanosti u istog polimorfizma pokazale su njegovu povezanost s podskupinom izoliranih anomalija ( $p=1.25\times 10^{-5}$ ) i to sa razvojnim anomalijama srca ( $p=5,12\times 10^{-8}$ ) i bubrega ( $p=4,18\times 10^{-5}$ ).

Polimorfizam rs9936833 u blizini gena *FOXF1* pokazao je genotipsku povezanost s prirođenim malformacijama ( $p=0,034$ ), dok ostala dva polimorfizma nisu pokazala. Analizom distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama uz uključen spol utvrdili smo da je OR za pojavnost prirođenih malformacija u skupini muškog spola za 1,8 puta veći nego u skupini ženskog spola ( $p=0,038$ ).

Rezultati ovog istraživanja po prvi put su pokazali da su polimorfizmi rs12329305 gena *OSRI* i rs9936833 gena *FOXF1*, kao i muški spol, čimbenici rizika za nastanak različitih tipova prirođenih malformacija u mrtvorodene/neonatalno umrle djece.

## 8. SUMMARY

### **The *OSRI*, *FOXF1*, *HOXA1* and *MTRR* Gene Polymorphisms as Risk Factors for Congenital Malformations**

We tested the association of four development-related gene polymorphisms with congenital anomalies. We assumed that those polymorphic variants may be a risk factor for developmental disorders.

We analyzed 140 DNA samples isolated from archived paraffin tissue of deceased patients in whom fetal/neonatal autopsy examination had shown congenital malformations versus a control group of healthy children for four different polymorphisms: *OSRI* rs12329305, rs9936833 near *FOXF1*, *HOXA1* rs10951154 and *MTRR* rs326119. These polymorphisms were genotyped using the TaqMan allelic discrimination assay. Association analysis was performed on the allelic and genotypic distribution between the two tested groups.

Significant allelic and genotypic association with stillborn/neonatal death was observed for rs12329305 ( $p=7\times 10^{-4}$ ,  $p=0.0013$ , respectively). In addition, association analysis for the same polymorphism was shown in the subgroup with isolated anomalies ( $p=1.25\times 10^{-5}$ ), particularly in the subgroup of cases with kidney and heart anomalies ( $p=4.18\times 10^{-5}$ ,  $p=5.12\times 10^{-8}$ , respectively).

Polymorphism rs9936833 near the *FOXF1* gene showed only genotypic association with congenital malformations ( $p=0.034$ ), when we compared minor allele heterozygotes and homozygotes versus major allele homozygotes, while the other two polymorphisms were not revealed. We also found that the OR for congenital malformations occurrence was 1.8 times higher in males than in females ( $p = 0.038$ ), when we analysed the genotypic distribution of four examined polymorphisms along with sex.

This is the first study, as far as we know, that showed the *OSRI* gene polymorphism rs12329305 and rs9936833 near *FOXF1*, as well as male sex, are risk factors for different types of congenital malformations in cases of stillborn/neonatal death.

## 9. LITERATURA

1. Jones KL. *Smith's Recognizable Patterns Of Human Malformation*. Sixth Edition. Philadelphia; Elsevier Saunders, 2006.
2. Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. Fourth Edition. Philadelphia: Esvier – Health Sciences Division, 2011.
3. Jones KL, Jones MC. A Clinical Approach to the Dysmorphic Child. In: Rimoin DL (ed). *Principles and Practice of Medical Genetics*. New York, Churchill Livingstone Publishers: 1983.
4. WHO. Birth defects. Report by the Secretariat. 2009.
5. Dolk H, Loane M, Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol* 2010;686:349-64.
6. Boyle B, McConkey R, Garne E et al. Trends in the prevalence, risk and pregnancy outcome of multiple births with congenital anomaly: a registry-based study in 14 European countries 1984-2007. *BJOG* 2013;120(6):707-16.
7. Glinianaia SV, Rankin J, Wright C. Congenital anomalies in twins: a register-based study. *Hum Reprod* 2008;23(6):1306-11.
8. Cui W, Ma CX, Tang Y et al. Sex differences in birth defects: a study of opposite-sex twins. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73(11):876-80.
9. Broussard CS, Gilboa SM, Lee KA, Oster M, Petrini JR, Honein MA. Racial/ethnic differences in infant mortality attributable to birth defects by gestational age. *Pediatrics* 2012;130(3):e518-27.
10. Kochanek KD, Kirmeyer SE, Martin JA, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics: 2009. *Pediatrics* 2012;129(2):338-48.
11. Adams-Chapman I, Hansen NI, Shankaran S. Ten-year review of major birth defects in VLBW infants. *Pediatrics* 2013;132(1):49-61.
12. Honein MA, Kirby RS, Meyer RE et al. The association between major birth defects and preterm birth. *Matern Child Health J* 2009;13(2):164-75.
13. Goldenberg RL, Kirby R, Culhane JF. Stillbirth: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16(2):79-94.
14. Pauli RM, Reiser CA, Lebovitz RM, Kirkpatrick SJ. Wisconsin Stillbirth Service Program: I. Establishment and assessment of a community-based program for etiologic investigation of intrauterine deaths. *Am J Med Genet* 1994;50(2):116–34.

15. Silver RM. Fetal death. *Obstet Gynecol* 2007;109(1):153–67.
16. Korteweg FJ, Bouman K, Erwich JJ et al. Cytogenetic analysis after evaluation of 750 fetal deaths: proposal for diagnostic workup. *Obstet Gynecol* 2008;111(4):865-74.
17. Feenstra I, Fang J, Koolen D et al. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities. *Eur J Med Genet* 2006;49(4):279-91.
18. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 3rd ed. New York, London: Garland Science, 2004.
19. Yeshaya J, Amir I, Rimon A, Freedman J, Shohat M, Avivi L. Microdeletion syndromes disclose replication timing alterations of genes unrelated to the missing DNA. *Mol Cytogenet* 2009;2:11.
20. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106(29):12031-6.
21. Davies GE, Howard CM, Farrer MJ et al. Genetic variation in the COL6A1 region is associated with congenital heart defects in trisomy 21 (Down's syndrome). *Ann Hum Genet* 1995;59(Pt 3):253-69.
22. Sailani MR, Makrythanasis P, Valsesia A et al: The complex SNP and CNV genetic architecture of the increased risk of congenital heart defects in Down syndrome. *Genome Res* 2013;23(9):1410-21.
23. Ackerman C, Locke AE, Feingold E et al. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down-syndrome-associated atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 2012;91(4):646-59.
24. Grattau Y, Blehaut H, Megarbane A et al. Molecular signatures of cardiac defects in Down syndrome lymphoblastoid cell lines suggest altered ciliome and Hedgehog pathways. *PLoS One* 2012;7(8):e41616.
25. Weber S. Novel genetic aspects of congenital anomalies of kidney and urinary tract. *Curr Opin Pediatr* 2012;24(2):212-8.
26. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008;451(7181):943-8.
27. Makki N, Capecchi MR. Identification of novel Hoxa1 downstream targets regulating hindbrain, neural crest and inner ear development. *Dev Biol* 2011;357(2):295-304.
28. Hong YS, Kim SY, Bhattacharya A et al. Structure and function of the HOXA1 human homeobox gene cDNA. *Gene* 1995;159(2):209-14.

29. Bosley TM, Alorainy IA, Salih MA et al. The clinical spectrum of homozygous HOXA1 mutations. *Am J Med Genet A* 2008;146A(10):1235-40.
30. Tischfield MA, Bosley TM, Salih MA et al. Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nat Genet* 2005;37(10):1035-7.
31. Ingram JL, Stodgell CJ, Hyman SL et al. Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: genetic susceptibility to autism spectrum disorders. *Teratology* 2000;62(6):393-405.
32. Conciatori M, Stodgell CJ, Hyman SL et al. Association between the HOXA1 A218G Polymorphism and Increased Head Circumference in Patients with Autism. *Biol Psychiatry* 2004;55(4):413-9.
33. Muscarella LA, Guarnieri V, Sacco R et al. HOXA1 gene variants influence head growth rates in humans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B(3):388-90.
34. Siegmund KD, Connor CM, Campan M et al. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* 2007;2(9):e895.
35. Raznahan A, Lee Y, Vaituzis C et al. Allelic variation within the putative autism spectrum disorder risk gene homeobox A1 and cerebellar maturation in typically developing children and adolescents. *Autism Res* 2012;5(2):93-100.
36. Liu J, Wang B, Chen X et al. HOXA1 gene is not potentially related to ventricular septal defect in Chinese children. *Pediatr Cardiol* 2013;34(2):226-30.
37. Katoh M. Molecular cloning and characterization of OSR1 on human chromosome 2p24. *Int J Mol Med* 2002;10(2):221-5.
38. Wang Q, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Jiang R. Odd-skipped related 1 (Odd 1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol* 2005;288(2):582-94.
39. James RG, Kamei CN, Wang Q, Jiang R, Schultheiss TM. Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells. *Development* 2006;133(15):2995-3004.
40. Mudumana SP, Hentschel D, Liu Y, Vasilyev A, Drummond IA. odd skipped related1 reveals a novel role for endoderm in regulating kidney versus vascular cell fate. *Development* 2008;135(20):3355-67.

41. Yamauchi M, Kawai S, Kato T, Ooshima T, Amano A. Odd-skipped related 1 gene expression is regulated by Runx2 and Ikzf1 transcription factors. *Gene* 2008;426(1-2):81-90.
42. Zhang Z, Iglesias D, Eliopoulos N et al. A variant OSR1 allele which disturbs OSR1 mRNA expression in renal progenitor cells is associated with reduction of newborn kidney size and function. *Hum Mol Genet* 2011;20(21):4167-74.
43. Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004;25(5):1495–500.
44. Larsson C, Hellqvist M, Pierrou S et al. Chromosomal localization of six human forkhead genes, freac-1, -3, -4, -5, -6 and -8. *Genomics* 1995;30(3):464-9.
45. Hellqvist M, Mahlapuu M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P. Differential activation of lung-specific genes by two forkhead proteins, FREAC-1 and FREAC-2. *J Biol Chem* 1996;271(8):4482-90.
46. Mahlapuu M, Enerbäck S, Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development* 2001;128(12):2397-406.
47. Stankiewicz P, Sen PP, Bhatt SS et al. Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of FOXF1 cause alveolar capillary dysplasia and other malformations. *Am J Hum Genet* 2009;84(6):780–91.
48. Shaw-Smith C. Genetic factors in esophageal atresia, tracheo-esophageal fistula and the VACTERL association: roles for FOXF1 and the 16q24.1 FOX transcription factor gene cluster, and review of the literature. *Eur J Med Genet* 2010;53(1):6-13.
49. Su Z, Gay LJ, Strange A et al. Common variants at the MHC locus and at chromosome 16q24.1 predispose to Barrett's esophagus. *Nat Genet* 2012;44(10):1131-6.
50. Leclerc D, Wilson A, Dumas R et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):3059-64.
51. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014;533(1):11-20.
52. Bailey LB, Berry RJ. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage. *Am J Clin Nutr* 2005;8(5):1213S-1217S.

53. 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(5):911-7.
54. Huhta JC, Linask K, Bailey L. Recent advances in the prevention of congenital heart disease. *Curr Opin Pediatr* 2006;18(5):484-9.
55. Ouyang S, Li Y, Liu Z, Chang H, Wu J. Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. *Gene* 2013;515(2):308-12.
56. Cai B, Zhang T, Zhong R et al. Genetic variant in MTRR, but not MTR, is associated with risk of congenital heart disease: an integrated meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(3):e89609.
57. Shaw GM, Lu W, Zhu H et al. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Med Genet* 2009;10:49.
58. Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2007;115(23):2995-3014.
59. Wang B, Liu M, Yan W et al. Association of SNPs in genes involved in folate metabolism with the risk of congenital heart disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26(18):1768-77.
60. Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143A(9): 952-60.
61. Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem NT. Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG* 2006;113(12):1412-8.
62. Christensen KE, Zada YF, Rohlicek CV et al. Risk of congenital heart defects is influenced by genetic variation in folate metabolism. *Cardiol Young* 2013;23(1):89-98.
63. Elmore CL, Wu X, Leclerc D. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol Genet Metab* 2007;91(1):85-97.
64. Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(25):9476-81.



65. Zhao JY, Yang XY, Gong XH et al. Functional variant in methionine synthase reductase intron-1 significantly increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Circulation* 2012;125(3):482-90.
66. Van Beynum IM, Kouwenberg M, Kapusta L et al. MTRR 66A>G polymorphism in relation to congenital heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(11):1317-23.
67. Zhou D, Mei Q, Luo H, Tang B, Yu P. The polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, methionine synthase reductase, and the risk of colorectal cancer. *Int J Biol Sci* 2012;8(6):819-30.
68. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
69. Gregory TR. "Synergy between sequence and size in Large-scale genomics". *Nat Rev Genet* 2005;6 (9): 699-708.
70. Qu H1, Fang X. A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013;11(3):135-4171.
71. Marian AJ. Nature's genetic gradients and the clinical phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(6):537-9.
72. Maurano MT, Humbert R, Rynes E et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* 2012;337(6099):1190-5.
73. Marian AJ. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res* 2012;159(2):64-79.
74. Zhang X, Bailey SD, Lupien M. Laying a solid foundation for Manhattan--'setting the functional basis for the post-GWAS era'. *Trends Genet* 2014;30(4):140-9.
75. Dos Reis GS, Simões E Silva AC, Freitas IS et al. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *J Pediatr* 2014;90(1):58-64.
76. McBride KL, Zender GA, Fitzgerald-Butt SM et al. Association of common variants in ERBB4 with congenital left ventricular outflow tract obstruction defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91(3):162-8.
77. Deng X, Zhou J, Li FF et al. Characterization of nodal/TGF-lefty signaling pathway gene variants for possible roles in congenital heart diseases. *PLoS One* 2014;9(8):e104535.
78. Ludwig KU, Böhmer AC, Rubini M, Mossey PA, Herms S, Nowak S. Strong association of variants around FOXE1 and orofacial clefting. *J Dent Res* 2014;93(4):376-81.

79. Chen KH, Chen LL, Li WG, Fang Y, Huang GY. Maternal MTHFR C677T polymorphism and congenital heart defect risk in the Chinese Han population: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2013;12(4):6212-9.
80. de Miranda DM, Dos Santos Júnior AC, Dos Reis GS et al. PAX2 Polymorphisms and Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary Tract in a Brazilian Pediatric Population: Evidence for a Role in Vesicoureteral Reflux. *Mol Diagn Ther* 2014;18(4):451-7.
81. Merks JH, van Karnebeek CD, Caron HN, Hennekam RC. Phenotypic abnormalities: terminology and classification. *Am J Med Genet A* 2003;123A(3):211-30.
82. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat Med* 2002;21(1):35-50.
83. Guey LT, Kravic J, Melander O et al. Power in the phenotypic extremes: a simulation study of power in discovery and replication of rare variants. *Genet Epidemiol* 2011; doi: 10.1002/gepi.20572.
84. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009;10(4):241-51.
85. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualisation of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263-5.
86. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 1908;28(706):49-50.
87. Weinberg W. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh Wuerth Ver vaterl Natkd* 1908;64:368-382.
88. Wigginton JE, Abecasis GR. PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* 2005;21(16):3445-7.
89. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One* 2007;2(6):e537.
90. Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol* 2003;56(3):184-6.
91. Lozić B, Krželj V, Kuzmić-Prusac I et al. The OSR1 rs12329305 polymorphism contributes to the development of congenital malformations in cases of stillborn/neonatal death. *Med Sci Monit* 2014;20:1531-8.
92. Mott JC. Patent ductus arteriosus: experimental aspects. *Arch Dis Child* 1980; 55(2):99-105

93. Leal SD, Cavallé-Garrido T, Ryan G, Farine D, Heilbut M, Smallhorn JF. Isolated ductal closure in utero diagnosed by fetal echocardiography. *Am J Perinatol* 1997; 14(4):205-10.
94. Gorlov IP, Gorlova OY, Sunyaev SR, Spitz MR, Amos CI. Shifting paradigm of association studies: value of rare single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2008;82(1):100-12.
95. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19(3):212-9.
96. Gao Y, Lan Y, Ovitt CE, Jiang R. Functional equivalence of the zinc finger transcription factors *Osr1* and *Osr2* in mouse development. *Dev Biol* 2009; 328(2):200-9.
97. Kawai S, Kato T, Inaba H, Okahashi N, Amano A. Odd-skipped related 2 splicing variants show opposite transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(1):306-11.
98. Lan Y, Kingsley PD, Cho ES, Jiang R. *Osr2*, a new mouse gene related to *Drosophila* odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development. *Mech Dev* 2001;107(1-2):175-9.
99. Xie J, Yoon J, Yang SS, Lin SH, Huang CL. WNK1 protein kinase regulates embryonic cardiovascular development through the OSR1 signaling cascade. *J Biol Chem* 2013;288(12):8566-74.
100. Martin V, Shaw-Smith C. Review of genetic factors in intestinal malrotation. *Pediatr Surg Int* 2010; 26(8):769-81.
101. Sen P, Yang Y, Navarro C et al. Novel FOXF1 mutations in sporadic and familial cases of alveolar capillary dysplasia with misaligned pulmonary veins imply a role for its DNA binding domain. *Hum Mutat* 2013;34(6):801-11.
102. Yu S, Shao L, Kilbride H, Zwick DL. Haploinsufficiencies of FOXF1 and FOXC2 genes associated with lethal alveolar capillary dysplasia and congenital heart disease. *Am J Med Genet A* 2010 ;152A(5):1257-62.
103. Agochukwu NB, Pineda-Alvarez DE, Keaton AA et al. Analysis of FOXF1 and the FOX gene cluster in patients with VACTERL association. *Eur J Med Genet* 2011; 54(3):323-8.
104. Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS. New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics* 2010;125(2):e214-24.

105. Samanek M. Boy:girl ratio in children born with different forms of cardiac malformation: a population-based study. *Pediatr Cardiol* 1994;15(2):53-7.
106. Miller-Hance WC, Tacy TA. Gender differences in pediatric cardiac surgery: the cardiologist's perspective. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128(1):7-10.
107. Alicelebić S, Kapić D, Mornjaković Z. Urinary system birth defects in surgically treated infants in Sarajevo region of Bosnia and Herzegovina. *Bosn J Basic Med Sci* 2008;8(2):126-30.
108. Czichos E, Kałużyński A, Krawczyk T, Kałużyńska A, Finke D, Kulig A. The spectrum of congenital malformations of the urinary tract in fetuses and newborns in autopsies in 1989-2002. *Pol Merkur Lekarski* 2005;18(103):78-81.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime: **Bernarda Lozić**

Mjesto i datum rođenja: Sinj, 17.01.1965.

Kućna adresa: Osječka 28, 21000 Split

Adresa na poslu: KBC Split, Klinika za dječje bolesti, Spinčićeva 1

Telefon: 021-556-025 (500)

Fax: 021 556-590

e-mail: [blozic@kbsplit.hr](mailto:blozic@kbsplit.hr)

### Akademski stupanj

- 1989: Doktor medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski studij u Splitu, Republika Hrvatska
- 2009: Magistar znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Republika Hrvatska, u području biomedicine i zdravstva, polju kliničke medicinske znanosti, grana GENETIKA

### Sveučilišna edukacija

- 1983-1989: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski studij u Splitu, Republika Hrvatska
- 1992-1993: Poslijediplomski stručni studij medicinske genetike, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Republika Hrvatska
- 1999-2000: Poslijediplomski stručni studij Kliničke pedijatrije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Republika Hrvatska
- 2002-2003: Poslijediplomski znanstveni studij "Temeljne i kliničke medicinske znanosti" smjer Klinička medicina, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Republika Hrvatska

### Stručna edukacija

- 1998-2002: Specijalizacija iz Pedijatrije
- 2007-2009: Subspecijalizacija iz Medicinske genetike

## **Zaposlenja**

1990-1991:	Pripravnički staž, KBC Split
1991-1992:	Opća praksa, Sinj, RH
1992-1994:	Opća praksa, Ministarstvo obrane RH
1994 do sada	KBC Split, Klinika za dječje bolesti

## **Stručno i znanstveno usavršavanje:**

2003-2004: ( 1 godina)	Postdoctoral research fellow at The University of Texas Health Science Centre at San Antonio; USA
2006: (5 dana)	Hybride course in genetic counseling in practice; European school of genetic medicine (November 9th-14th); SLOVENIA
2008: (2 dana)	Hybrid course in non-invasive prenatal diagnosis (February 24 th -25 th ); CROATIA
2010: (5 dana)	Hybrid course in Medical Genetics (May 23th- 28th); CROATIA
2011: (2 dana)	EuroGentest i radionica o akreditaciji u svrhu poboljšanja genetskih testiranja u Europi
2012: (5 dana)	Hybride course in Medical Genetics (May 20h-25th); CROATIA

## **Sudjelovanje u nastavi**

- od 2005. god. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet: predmet Pedijatrija za studente medicine
- od 2006. god. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet: izborni predmeti na studiju medicine i doktorskom studiju Biologija novotvorina: Kako nastaju tumori i citogenetika tumora (voditelj predmeta: prof. dr. sc. Tatijana Zemunik)
- od 2010. god. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet: predmet Pedijatrija za studente dentalne medicine
- od 2011. god. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet: VIP (veliki izborni predmet) pedijatrije) za studente medicine (voditelj oba predmeta: prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj)
- od 2012. god. Sveučilište u Splitu, Dodiplomska nastava, Odjel zdravstvenih studija, Pedijatrija s neonatologijom I ( voditelj predmeta: prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj)

## **Izbor u suradničko zvanje**

Listopad 2008. god. - naslovni asistent za znanstveno područje biomedicine i zdravstva, polje kliničke medicinske znanosti, grana pedijatrije, u katedri Pedijatrija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

## **Znanstveni projekt:**

- 2014. god. HRZZ projekt „Otkrivanje novih genskih lokusa uključenih u regulaciju funkcije štitne i doštitne žljezde“ – voditelj prof. dr. sc. Tatijana Zemunik, broj projekta: 1498.

## **Popis radova:**

Članci objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:

1. **Lozić B**, Krželj V, Kuzmić-Prusac I, Kuzmanić-Šamija R, Čapkun V, Lasan R, Zemunik T. The OSR1 rs12329305 polymorphism contributes to the development of congenital malformations in cases of stillborn/neonatal death. *Med Sci Monit.* 2014;28;20:1531-8.
2. Kuzmanić Šamija R, Kolić K, Markić J, Polić B, Kalebić Jakupčević K, **Lozić B**, Lazibat I, Unić I, Zemunik T. Correlation of serial MRI findings and clinical outcome in the first Croatian patient with acute necrotizing encephalopathy. *Croat Med J.* 2014;55(4):431-3.
3. Kuzmanić Šamija R, Primorac D, Rešić B, Pavlov V, Čapkun V, Punda H, **Lozić B**, Zemunik T. Association of NOS3 gene variants and clinical contributors of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(10):869-75.
4. Pavlov N, Pavlov V, Čulić S, Armanda V, Siebert R, **Lozić B**, Forempoher G, Lukšić B, Perić I, Goić-Barisić I. Endobronchial ALK+ Anaplastic Large-cell Lymphoma Resembling Asthma in a 13-Year-Old Girl. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013;35(1):e4-6.
5. **Lozić B**, Ljubković J, Gabrić Pandurić D, Saltvig I, Kutsche K, Krželj V, Zemunik T. Oculo-facio-cardio-dental syndrome in three succeeding generations: genotypic data and phenotypic features. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(12):1315-9.

6. **Lozić B**, Čulić V, Lasan R, Tomasović M, Šamija RK, Zemunik T. Complete trisomy 10p resulting from an extra stable telocentric chromosome. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(7):1778-81.
7. **Lozić B**, Primorac D, Glavinić R, Šamija RK, Zemunik T. Analysis of the C609T polymorphism of NQO1 gene in South Croatian patients with hematological malignancies. *Coll Antropol*. 2011;35:385-8.
8. Čulić V, **Lozić B**, Kuzmić-Prusac I, Mijaljica G, Pavelić J. Full trisomy 5 in a sample of spontaneous abortion and Arias Stella reaction. *Med Sci Monit*. 2011;17:116-9.
9. Kuzmanić Šamija R, Primorac D, Resić B, **Lozić B**, Krželj V, Tomasović M, Stoini E, Samanović L, Benzon B, Pehlić M, Boraska V, Zemunik T. Association of NOS3 tag polymorphisms with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Croat Med J*. 2011;52:396-402.
10. Kuzmanić-Šamija R, Resić B, Tomasović M, Gabrić Pandurić D, **Lozić B**, Lozić M, Resić J. West syndrome with periventricular leukomalacia: ten-year clinical study. *Coll Antropol*. 2008; 32 Suppl 1:105-11.
11. Dokić H, Barišić I, Čulić V, **Lozić B**, Hećimović S. Haplotype and AGG interspersions analysis of FMR1 alleles in a Croatian population: no founder effect detected in patients with fragile X syndrome. *Hum Biol*. 2008;80:581-7.

#### Članci objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u SCI-Expanded

1. Kuzmanić Šamija Radenka, **Lozić Bernarda**, Fradelić Dragana, Kolić Krešimir. Akutna nekrotizirajuća encefalopatija. *Paediatr Croat*. 2012;56:143-46.
2. Kuzmanić-Šamija R, **Lozić B**, Rešić B, Tomasović M, Vlastelica Ž, Metličić V, Sedlakova J. Infantilni oblik facioskapulohumeralne mišićne distrofije. *Paediatr Croat* 2009;53:153-157.
3. **Lozić B**, Zemunik T. Klinički značaj citogenetike u leukemijama dječje dobi. *Paediatr Croat*. 2013; 57(Supl 1):218-25.
4. Lasan Trčić R, Kardum-Skelin I, Konja J, Rajić Lj, Bilić E, Femenić R, Pavlović M, **Lozić B**, Čulić S, Jelić-Puškarčić B, Begović D. Citogenetske karakteristike limfoma. *Paediatr Croat*. 2013;57(Supl 1):226-32.

#### Članci objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u SCOPUS-u

1. Cikojević D, Čolović Z, **Lozić B**, Klančnik M. Aggressive middle turbinate osteoblastoma with intracranial extension: a case report. *J Med Case Rep*. 2014;8:161.



2. Brisky, Livia; Krželj, Vjekoslav; **Lozić, Bernarda**; Kuzmanić Šamija, Radenka; Brisky, Tibor. Uvođenje obveznog cijepljenja protiv velikih boginja na području Dalmacije i grada Splita u prvoj polovini 19. stoljeća. *Paediatr Croat*. 2012;56;83-88.
  3. **Lozić B**, Cikojević D, Ledenko V, Klančnik M, Lasan R, Zemunik T. Nasal dermal sinus cysts with intracranial extension in a child mosaic for a supernumerary ring chromosome 20, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol Extra*. 2012;7(2)73-78.
  4. **Lozić B**. Povezanost genetskih sindroma s malignim bolestima dječje dobi. *Paediatr Croat* 2006; 50 (Supl 1):249-253.
  5. Čulić V, Balarin L, Zierler H, Sertić J, Čulić S, Rešić B, **Lozić B**, Glamuzina D, Primorac D, Kaliterna M, Tadić T, Janković S, Wagner K. Presentation of two rare mutations in patients with CF. *Paediatr Croat* 2000;44:161-5.
- Sudjelovala sam na brojnim domaćim i međunarodnim stručnim i znanstvenim kongresima iz područja pedijatrije i medicinske genetike, a što potvrđuju sažeci od kojih su neki objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Indeks Medicus/Excerpta Medica.