

# VARIJANTE SEKVENCE U MTHFR GENU I DNA METILACIJA U IDIOPATSKIM SPONTANIM PRIJEVREMENIM PORODIMA

---

Šverko, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:210952>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ

Roberta Šverko

VARIJANTE SEKVENCE U *MTHFR* GENU I DNA METILACIJA U IDIOPATSKIM  
SPONTANIM PRIJEVREMENIM PORODIMA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ

Roberta Šverko

VARIJANTE SEKVENCE U *MTHFR* GENU I DNA METILACIJA U IDIOPATSKIM  
SPONTANIM PRIJEVREMENIM PORODIMA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Nina Pereza, dr. med

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u  
sastavu:

1. prof. dr. sc. Saša Ostojić (predsjednik Povjerenstva)

2. prof. dr. sc. Smiljana Ristić

3. doc. dr. sc. Jadranka Vraneković

Rad sadrži 38 stranica, 2 slike, 6 tablica, 42 literaturna navoda.

## **POSVETA I ZAHVALA**

Ovaj rad želim posvetiti svim dragim ljudima koji su mi oblikovali život do sadašnjeg trenutka i pomogli mi da danas budem osoba koja jesam. Znate koji ste.

Veliko hvala mojoj mentorici, Nini Perezi, koja je strpljivo čekala i ispravljala dijelove moga rada. Moram priznati da je bila tu za mene u svako doba dana, uvijek spremna podijeliti svoju pozitivnu energiju sa mnom.

Na samom kraju, htjela bih se zahvaliti i svojoj obitelji, koja je svakim danom sve veća, na bezuvjetnoj podršci i ohrabrenju kad mi je najviše trebalo. Posebno bih htjela istaknuti svoju majku koja me uvijek nesebično podržavala i motivirala da ostvarim svoje snove. Hvala ti mama, ovim sam radom korak bliže.

# SADRŽAJ RADA

1. UVOD .....	1
1.1. Definicija i podjele prijevremenog poroda .....	1
1.2. Čimbenici rizika za prijevremeni porod .....	1
1.3. <i>MTHFR</i> gen .....	2
1.4. Povezanost <i>MTHFR</i> C677T i prijevremenih poroda .....	4
1.5. DNA metilacija .....	5
1.6. Povezanost DNA metilacije i prijevremenih poroda .....	7
2. SVRHA RADA .....	8
3. ISPITANICI I POSTUPCI .....	9
3.1. Ispitanici .....	9
3.2. Postupci .....	11
3.2.1. Izolacija genomske DNA molekule .....	11
3.2.2. Genotipizacija .....	11
3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu .....	14
3.3. Statistička obrada rezultata .....	14
3.4. Sustavni pregled literature .....	15
3.4.1. Pretraživanje literature .....	15
3.4.2. Odabir studija .....	16
3.4.3. Izvlačenje podataka .....	16

4. REZULTATI.....	17
4.1. Povezanost <i>MTHFR</i> C677T i prijevremenih poroda.....	17
4.2. Povezanost DNA metilacije i prijevremenih poroda.....	19
5. RASPRAVA .....	22
5.1. Povezanost <i>MTHFR</i> C677T i prijevremenih poroda.....	22
5.2. Povezanost DNA metilacije i prijevremenih poroda.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. SAŽETAK .....	31
8. SUMMARY.....	32
9. LITERATURA .....	33
10. ŽIVOTOPIS.....	38

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA:

<b>CpG</b>	citozin-gvanin dinukleotidna sekvenca (engl. <i>cytosine-guanine sequence</i> )
<b>DMR</b>	diferencijalno metilirana regija
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferaza
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleozid trifosfat (engl. <i>deoxynucleoside triphosphate</i> )
<b>LINE</b>	dugi raspršeni nukleotidni elementi (engl. <i>long interspersed nuclear elements</i> )
<b>MBD</b>	metil-CpG vezujuća domena (engl. <i>methyl-CpG-binding domain</i> )
<b>MTHFR</b>	metilentetrahidrofolat reduktaza
<b>PCR</b>	polimerazna lančana reakcija (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PP</b>	prijevremeni porod
<b>RFLP</b>	polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. <i>restriction fragment-length polymorphism</i> )
<b>SAM</b>	S-adenozil metionin
<b>SNP</b>	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )



# 1. UVOD

## 1.1. Definicija i podjele prijevremenog poroda

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, prijevremenim porodom (PP) smatra se svaki porod prije navršenog 37. tjedna gestacije, odnosno prije navršenih 259 dana počevši od prvog dana zadnje menstruacije (1). Globalna učestalost PP-a kreće se od 5 do 18 %. PP uz prateće komplikacije vodeći je uzrok perinatalnog morbiditeta i mortaliteta, a može imati dugoročne posljedice i za zdravlje majki (1, 2).

Ovisno o gestacijskoj dobi, PP možemo stupnjevati na: iznimno rani porod ili ekstremnu nedonošenost (engl. *extremely preterm*), <28 tjedana; rani porod ili tešku nedonošenost (engl. *very preterm*), za nedonošče rođeno između 28 i 31+6/7 tjedana te umjerenu ili blagu nedonošenost (engl. *moderate to late preterm*), između 32 i 36+6/7 tjedana (1-3).

S obzirom na kliničku prezentaciju, PP može biti spontani (zbog spontanog prijevremenog porođaja i/ili prijevremene rupture vodenjaka) ili medicinski induciran (zbog maternalnih (eklampsija, preeklampsija, placentalna abrupcija ili placenta previa) i/ili fetalnih faktora (intrauterini zastoj rasta ili fetalni distress sindrom)) (4).

## 1.2. Čimbenici rizika za prijevremeni porod

Postoje brojni čimbenici rizika koji mogu utjecati na veću učestalost PP-a, kao što su niži stupanj edukacije majke, niža gestacijska dob, gestacijska hipertenzija, gestacijski dijabetes, konzumacija alkohola, pušenje itd. (5, 6). Unatoč brojnim rizičnim čimbenicima,

točan uzrok PP još uvijek se ne zna (7). PP danas se smatra multifaktorijskim, kompleksnim kliničkim sindromom koji je posljedica višestrukih mehanizama (1, 8-10).

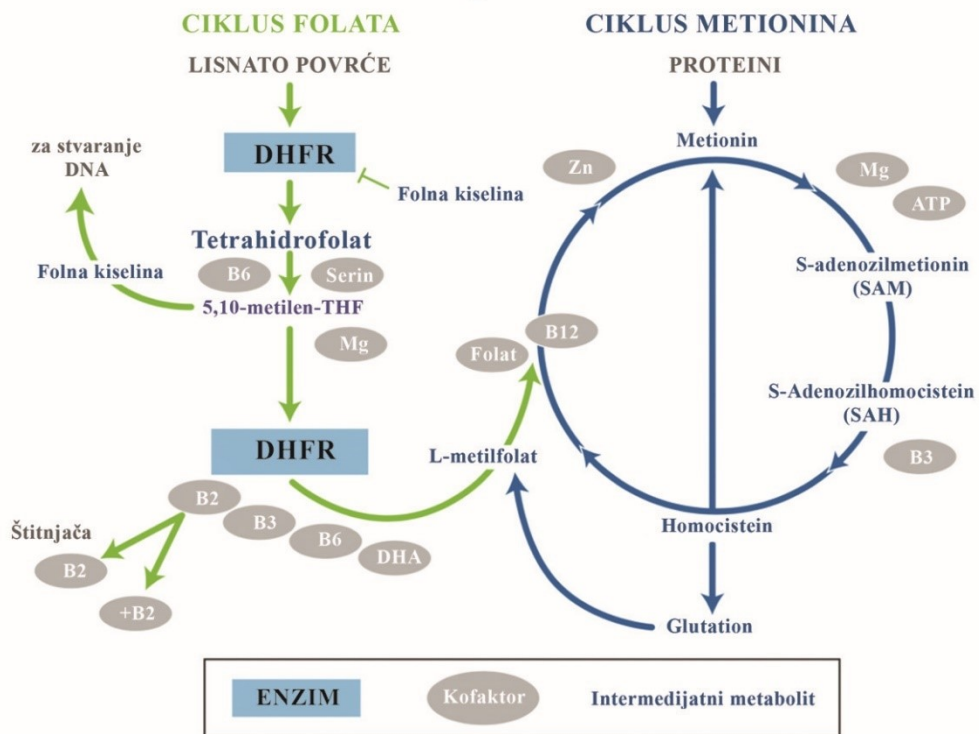
Posljednjih nekoliko godina sve se više istražuje moguća genetička, odnosno epigenetička podloga PP-a. Naime, epidemiološka istraživanja pokazuju da je rizik za PP povišen u žena koje imaju osobnu ili obiteljsku anamnezu PP-a, da postoji visok stupanj heritabilnosti te da se učestalost razlikuje ovisno o etnicitetu. Brojna istraživanja genetičke povezanosti pokazala su kako bi promjene u genu koji kodira metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), prvenstveno *MTHFR* C677T SNP, te promjene u DNA metilaciji mogle povećati predispoziciju za PP.

Unatoč brojnim istraživanjima, njihova povezanost s PP-om još uvijek nije jasna (5). Pravilno i rano identificiranje mogućih genetičkih i epigenetičkih uzroka PP-a pridonijelo bi njihovoj prevenciji i pravilnom liječenju (4, 11, 12).

### **1.3. *MTHFR* gen**

*MTHFR* gen kodira metilentetrahidrofolat reduktazu, enzim koji sudjeluje u ciklusu metilacije i katalizira pretvorbu 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat, spoj neophodan za remetilaciju homocisteina u metionin. Sastoji se od 11 egzona i smješten je na kratkom kraku kromosoma 1 (1p36.22) (5, 7, 13, 14). Metabolički put *MTHFR* gena prikazan je na slici 1. Na slici je istaknuta i važnost folne kiseline i vitamina B skupine kao koenzima neophodnih za pravilno funkcioniranje metaboličkog puta.

# Metilacijski ciklus



Slika 1. Metabolički put *MTHFR* (preuzeto i modificirano prema The GInstitute of Functional Medicine)

Jedna od najčešćih i najistraživanijih varijanta sekvence ovoga gena supstitucija je citozina u timin na poziciji 677 u egzonu 4 (*MTHFR* C677T (rs 1801133) (ALA222VAL)). Navedena zamjena može biti prisutna na oba kromosoma 1 i tada govorimo o homozigotima (TT) ili može biti prisutna na samo jednom od kromosoma i u tom se slučaju radi o heterozigotima (CT). Ako supstitucije nema, govorimo o normalnom redosljedu nukleotida (CC). Supstitucija citozina u timin dovodi do zamjene aminokiseline valin u alanin u kodiranom proteinu, što rezultira povećanom termolabilnosti *MTHFR* enzima, odnosno redukcijom aktivnosti (50-70 % smanjena aktivnost u homozigota i 30 % smanjena aktivnost u heterozigota) (8). Smanjena aktivnost posljedično vodi do smanjene konverzije

homocisteina u metionin i rezultira plazmatskom akumulacijom homocisteina (5). Povećanje plazmatske koncentracije homocisteina, odnosno hiperhomocisteinemija, izraženije je u homozigota (TT) (13). *MTHFR* C677T SNP istraživani su kao mogući čimbenik predispozicije za brojne bolesti i sindrome, između ostalog i za PP.

#### **1.4. Povezanost *MTHFR* C677T i prijevremenih poroda**

U novije se vrijeme sve više istražuje uloga *MTHFR* C677T SNP-a u predispoziciji za PP u žena. Brojna istraživanja i meta-analize pokazala su povezanost između *MTHFR* C677T SNP-a i PP-a, dok s druge strane postoje i pojedinačna istraživanja koja su objavila oprečne rezultate (5, 15-18). Najveća razina povezanosti s PP-om dosad se pokazala za skupine žena homozigota za *MTHFR* C677T SNP (TT) (5, 16, 18).

Pretpostavka o povezanosti *MTHFR* C677T SNP-a i PP-a bazira se na nakupljanju homocisteina u plazmi kao izravnoj posljedici smanjene aktivnosti *MTHFR* enzima. Postoje dva predložena mehanizma ove korelacije.

Prva pretpostavka nalaže kako povećanje razine homocisteina u plazmi ima izravan utjecaj na oštećenje endotela krvnih žila. Poznato je kako je za uredan tijek trudnoće potreban normalan razvoj i funkcija uteroplacentarne cirkulacije u majke. Placenta, koja omogućuje transport kisika i hranjivih tvari fetusu iz majčinog krvotoka, neprestano održava koagulacijski/antikoagulacijski sustav u ravnoteži. U slučaju smanjene funkcije *MTHFR* enzima, koja je prisutna u homozigota i heterozigota za *MTHFR* C677T, razvija se hiperhomocisteinemija koja potiče oksidativni stres i konstrikciju arteriola te dovodi do oštećenja endotela i placentarne tromboze (5, 19-21). Svaka od ovih patoloških promjena u uteroplacentarnom krvotoku može doprinijeti slabijem protoku krvi, protrombotskim

promjenama unutar krvnih žila, neadekvatnoj invaziji trofoblasta u uterine krvne žile i placentarnoj hipoperfuziji što posljedično vodi lošem ishodu trudnoće i može se prezentirati kao PP (5, 18, 22-24).

Drugi predloženi mehanizam nalaže kako hiperhomocisteinemija kao rezultat neadekvatne aktivnosti MTHFR enzima uslijed *MTHFR* C677T SNP-a ima utjecaj na epigenetičku regulaciju genoma kroz proces DNA metilacije. Iako istraživanja koja se bave ovim mehanizmom također pokazuju oprečne rezultate, pretpostavka je kako *MTHFR* C677T i povećana koncentracija homocisteina u plazmi (kao direktan pokazatelj niske razine folata u tijelu) korelira sa sniženom razinom DNA metilacije na specifičnim mjestima u genomu. Upravo bi ove epigenetičke modifikacije genoma mogle biti ključne za predispoziciju prema PP-ima (25).

Dobivene analize ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima na većim skupinama. Daljnja identifikacija *MTHFR* C677T SNP-a kao potencijalno važnog rizičnog faktora u etiologiji PP-a mogla bi imati ključnu ulogu u primarnoj prevenciji i probiru visokorizičnih trudnica u budućnosti (5).

## **1.5. DNA metilacija**

DNA metilacija je epigenetički mehanizam koji podrazumijeva kovalentno vezanje metilne skupine s donora (S-adenozil-metionin, odnosno SAM) na citozin koji prethodi gvaninu u CpG sekvenci u smjeru 5'-3' (26, 27). CpG dinukleotidi pojavljuju se pojedinačno ili u nakupinama (klasterima) u promotorskim regijama gena te u visoko ponovljenim sekvencama (dugi raspršeni nukleotidni elementi (engl. *long interspersed nucleotide elements* - LINE) i Alu repetitivni elementi), pri čemu njihova metilacija utječe na ekspresiju gena bez

mijenjanja njihove strukture (26, 28). Regije bogate CpG dinukleotidnim sekvencama, nazvane CpG otoci, čine 1-2% ljudskog genoma (28).

Smatra se kako 70% gena sadrži CpG otoke u promotorskoj regiji (27). Ako su CpG otoci u promotorskoj regiji metilirani, neće doći do transkripcije, translacije i samim time ekspresije metiliranoga gena (26). DNA metilacija inhibira transkripciju gena na način da interferira s vezivanjem transkripcijskih faktora, a s druge strane omogućuje vezivanje transkripcijskih represora (26).

DNA metilaciju kataliziraju enzimi iz obitelji DNA metiltransferaza (DNMT). Tri su glavna enzima koja sudjeluju u metilaciji: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. DNMT1 obnavlja već uspostavljeni obrazac metilacije nakon diobe kako bi novonastale stanice kćeri imale jednaki obrazac kao i početna stanica iz koje su nastale. Za razliku od njega, DNMT3A i DNMT3B mogu uspostaviti potpuno novi obrazac metilacije na nemodificiranoj DNA i poznate su kao *de novo* DNA metiltransferaze (26, 27).

DNA metilacija regulira veliki broj staničnih procesa, poput inaktivacije X kromosoma, uspostave genomskog upisa, regulacije tkivno-specifične ekspresije i očuvanja stabilnosti kromosoma. Važno je napomenuti kako DNA metilacija u različitim genomskim regijama može imati različiti utjecaj na gensku ekspresiju, što ovisi ponajprije o genskom slijedu nukleotida koji je metiliran (27).

Područja u genomu s različitim statusom DNA metilacije između pojedinih stanica, tkiva ili organizama u isto ili različito vremensko razdoblje nazivaju se diferencijalno metilirane regije (engl. *differentially methylated regions* – DMRs). Ove se regije smatraju mogućim funkcionalnim regijama koje su uključene u regulaciju genske ekspresije.

Važno je spomenuti kako je DNA metilacija važan epigenetički mehanizam koji može, pod utjecajem različitih endogenih i egzogenih čimbenika (npr. prehrana, različiti mikroorganizmi, BMI, stres, socio-ekonomsko okruženje i drugi) potencijalno mijenjati

ekspresiju gena i time uvjetovati pojavu novih obilježja (26). Poznato je kako na razinu DNA metilacije mogu utjecati i varijante sekvence u *MTHFR* genu, a poveznica ovih dvaju mehanizama mogla bi imati veliku ulogu u etiopatogenezi brojnih patoloških stanja (25). Zbog svega navedenog, obrasci metilacije danas se sve više istražuju.

## **1.6. Povezanost DNA metilacije i prijevremenih poroda**

Mogućnost da različiti endogeni i egzogeni čimbenici mogu uzrokovati epigenetičke promjene u DNA majke i fetusa koje bi mogle povećati rizik od PP-a sve se više istražuje (29, 30). Od svih epigenetičkih mehanizama, DNA metilacija najviše je prepoznata kao potencijalni mehanizam koji bi mogao pridonijeti takvom ishodu. Unatoč prepoznatoj važnosti, napravljeno je tek nekoliko istraživanja koja su se bavila korelacijom između metilacijskih obrazaca DNA majčinih tkiva (npr. posteljice) i rizikom od PP-a (9, 29-31).

Istraživanja su provedena na različitim skupinama, putem različitih metoda i s različitim rezultatima. Iz svih navedenih istraživanja jasno je kako su potrebne daljnje, opsežnije studije na raznovrsnijim populacijama da bi se razjasnila veza između statusa DNA metilacije majčinog genoma i rizika od PP-a. Dokaz istog omogućio bi identifikaciju metilacijskog statusa majčine krvi kao mogućeg rizičnog čimbenika za PP i tako omogućio rani probir i eventualnu intervenciju kod majki s povećanim rizikom (12, 30).

## 2. SVRHA RADA

Osnovni cilj ovog rada bio je ispitati ulogu *MTHFR* C677T SNP-a i DNA metilacije na predispoziciju za PP.

Specifični ciljevi bili su:

- 1) odrediti i usporediti učestalosti genotipova i alela *MTHFR* C677T SNP-a između žena s PP-om i žena kontrolne skupine,
- 2) ispitati povezanost genotipova i alela *MTHFR* C677T SNP-a s podložnošću za PP prema dominantnim, recesivnim i kodominantnim genetičkim modelima,
- 3) ispitati postoji li razlika u srednjim vrijednostima dobi majke, gestacijskoj dobi i težini nedonoščeta između genotipova *MTHFR* C677T SNP-a, i
- 4) provesti sustavni pregled literature o ulozi DNA metilacije kao čimbeniku podložnosti za PP.



### 3. ISPITANICI I POSTUPCI

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 50 žena s PP-om i 50 žena kontrola. U skupini žena s PP-om, primarni fokus rada bio je na ranom PP-u. Demografske i kliničke karakteristike žena s PP-om i nedonoščadi prikupljene su pomoću upitnika koji je oblikovan u skladu s postojećim genetičkim epidemiološkim studijama PP-a (32).

Uzorci ispitanica prikupljeni su na Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra u Rijeci i Odjelu za perinatologiju Univerzitetnog medicinskog centra u Ljubljani. Uzorci ispitanica prikupljeni u Hrvatskoj čine dio Biobanke TransMedRi - Banka biouzoraka u sklopu istraživanja prijevremenih poroda (EU-FP7 Regpot-2010-5, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, voditelj: prof. dr. sc. Saša Ostojić, dr. med.), a uzorci prikupljeni u Sloveniji čine dio banke uzoraka Kliničkog instituta za medicinsku genetiku Univerzitetnog kliničkog centra u Ljubljani (Slovenija).

U svih žena s PP-om zabilježena je jedna trudnoća koja je završila spontano iniciranim PP-om vaginalnim putem, prije 37. tjedna trudnoće. Gestacijska dob pri porodu bila je utvrđena prema anamnestičkim podacima zadnje menstruacije i potvrđena ultrazvučnim pregledom u prvom tromjesečju. U slučajevima gdje se gestacijska dob utvrđena anamnezom i ultrazvukom nisu slagale za više od 7 dana, gestacijska dob promijenjena je u skladu s ultrazvučnim nalazom u prvom trimestru. Nijedna od žena s PP-om nije imala rizične faktore za isti, uključujući dijabetes, hipertenziju, autoimune bolesti, alergijske bolesti, bubrežne bolesti, infekcije porođajnog kanala, in vitro fertilizaciju ili komplikacije u trudnoći. Nadalje, nijedno nedonošče nije imala kongenitalne anomalije ili znakove infekcije. Daljnje maternalne i novorođenačke karakteristike prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike žena s PP i nedonoščadi

<b>Maternalne karakteristike</b>	
Dob majke pri porodu (godine)	30 [17-42]*
Gestacijska dob pri porodu, n (%)	
Ekstremna nedonošenost <28 tjedana	28 (56%)
Teška nedonošenost 28-32 tjedna	12 (24%)
Umjerena nedonošenost 32-37 tjedna	10 (20%)
<b>Karakteristike nedonoščeta</b>	
Težina nedonoščeta pri porodu	1905 [620-2880]**
Kongenitalne anomalije, n	0
Dokazana infekcija, n	0

\*medijan i raspon

\*\*aritmetička sredina i raspon

Istraživanje je provedeno na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, kao dio znanstveno-istraživačkog projekta „Genetički i epigenetički čimbenici u etiologiji ponavljajućih spontanih pobačaja i spontanih prijevremenih poroda“ (Sveučilište u Rijeci, voditelj prof.dr.sc. Saša Ostojić, dr.med.).

Sve ispitanice su potvrdile pristanak za sudjelovanje u istraživanju davanjem pismene informirane suglasnosti. Provedeno istraživanje odobrila su etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Kliničkog bolničkog centra u Rijeci.

## 3.2. Postupci

Primjenjene vrste istraživanja bile su istraživanje parova (engl. *case-control study*) i sustavni pregled literature (engl. *systematic review*).

### 3.2.1. Izolacija genomske DNA molekule

Svim ispitanicama venepunkcijom je izvađeno 3 do 5 mililitara krvi u epruvetu s dodanim EDTA antikoagulansom. Izolacija genomske DNA provedena je na leukocitima periferne krvi pomoću kitova, prema uputama proizvođača (Qiagen FlexiGene DNA kit, Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka). Dobiveni uzorci pohranjeni su na -20C.

### 3.2.2. Genotipizacija

Genotipizacija *MTHFR* C677T SNP-a provedena je PCR-a i RFLP-a. Veličina restrikcijskog produkta za C alel je 198 bp, a za T alel 175 i 23 bp.

Detaljni sadržaj reakcijske smjese (engl. *PCR mix*) korišten za provođenje PCR metode opisan je u tablici 2. U PCR-u korištene su početnice oznake *MTHFR* C677T – F (slijed početnice: 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3') i *MTHFR* C677T – R (slijed početnice: 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3').

Tablica 2. Sadržaj PCR reakcijske smjese za analizu *MTHFR* C677T SNP-a

Reagens	1x (10 $\mu$ l)	Konačna koncentracija
10x PCR pufer	2,5 $\mu$ l	1 X
25mM MgCl	2,5 $\mu$ l	2,5 mM
10mM dNTP	0,5 $\mu$ l	0,2 mM
10x početnica <i>MTHFR</i> 677R	2,0 $\mu$ l	20 pmol
10x početnica <i>MTHFR</i> 677F	2,0 $\mu$ l	20 pmol
Bidestilirana voda	15,5 $\mu$ l	
Taq polimeraza	0,25 $\mu$ l	1,25 U/25 $\mu$ l
DNA	1,0 $\mu$ l	

Pripremljena reakcijska smjesa stavlja se u termociklere, specijalizirane uređaje koji omogućuju tijekom PCR reakcije. U našem istraživanju koristili smo Mastercycler personal, Eppendorf (Hamburg, Njemačka). Termociklери ponavljaju PCR reakciju u određenom broju ciklusa, pri čemu se svaki sastoji od tri osnovna koraka: denaturacije dvolančane DNA, hibridizacije početnica te elongacije lanaca i umnažanja produkta.

Broj novonastalih molekula DNA uvećava se geometrijskom progresijom. Tri navedena koraka ponavljaju se 20–45 puta pri čemu se željeni fragment DNA umnoži  $10^6$ – $10^9$  puta. Temperaturni ciklusi korišteni u našem istraživanju prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Temperaturni ciklusi korišteni za umnažanje odsječka *MTHR* gena potrebnog za analizu *MTHFR* C677T SNP-a

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.	94 °C	2 min	1x
2.	94 °C	30 sec	40x
	62 °C	30 sec	
	72 °C	30 sec	
3.	72 °C	7 min	1x

Nakon provedene PCR metode, restrikciju enzimima proveli smo koristeći preporučene smjernice proizvođača. U RFLP, DNA se pomoću restrikcijskih enzima cijepa na dijelove, pri čemu su restrikcijski fragmenti u gel elektroforezi razdvojeni prema njihovim dužinama.

Za restrikciju dobivenog produkta, napravili smo smjesu koja se sastojala od PCR produkta, *Hinfl* restrikcijskog enzima, bidestilirane vode i *cut smartpuffera*. Uzorci su se potom postavili u vodenu kupelj na 37°C kroz minimalno pola sata. Detaljan sadržaj restrikcijske smjese prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Sadržaj RFLP reakcijske smjese za analizu *MTHFR* C677T SNP-a

Reagens	Količina
<i>Cut smartpuffer</i>	2,0 µl
Enzim <i>Hinfl</i>	0,2 µl
Bidestilirana voda	7,8 µl
Produkt PCR	10 µl

### 3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Elektroforeza na agaroznom gelu zasniva se na različitoj pokretljivosti čestica u električnom polju, s obzirom na njihove karakteristike. Na pokretljivost, osim mase i naboja čestica, utječu i karakteristike pufera poput viskoznosti, pH vrijednosti, ionske jakosti i temperature. Važna je i jačina električne energije kojoj je polje izloženo i vrijeme trajanja elektroforeze.

Za provjeru dobivenih produkata koristili smo 3 % agarozni gel pripremljen s 50 mL TAE 1x pufera i 1,5 grama agaroze. Nakon dvije minute u mikrovalnoj pećnici, u gel smo dodali 15  $\mu$ l GelRed™ boje (Olerup SSP®, Saltsjöbaden, Sweden), koja se veže za DNA molekulu i omogućava njezinu vizualizaciju pod ultraljubičastim svjetlom. Osam mikrolitara svakog uzorka umnoženog odsječka DNA molekule pomiješano je s dva mikrolitara BPB boje (engl. *bromphenol blue*), pomoću koje je omogućeno praćenje elektroforeze. Takvi uzorci nanoseni su u jažice pripremljenog gela, kojeg smo izložili naponu od 80 V kroz 60 minuta.

### 3.3. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata korišten je program Statistica for Windows, inačica 13.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, Sjedinjene Američke države). Nadalje, za računanje omjera šansi (OR, engl. *odds ratio*) i 95 % intervala (95 % CI, engl. *95 % confidence intervals*) korišten je MedCalc for Windows, inačica 14.12.0. Hardy-Weinberg ravnoteža (HWR)

izračunata je koristeći Simple Hardy - Weinberg Calculator - Court Lab (Washington State University College of Veterinary Medicine, Pullman, WA, SAD).

Razlike u učestalosti genotipova i alela *MTHFR* C677T SNP-a između žena s PP-om i kontrola izračunate su pomoću Pearson chi-kvadrat testa ( $X^2$ ). Također, ovaj statistički test koristili smo i za izračunavanje odstupanja od HWR-a. Nadalje, povezanost između *MTHFR* C677T SNP-a i podložnosti za PP prema dominantnom, recesivnom i kodominantnim genetičkim modelima izračunata je pomoću OR i 95 % CI. Distribucija numeričkih varijabli testirana je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Kod normalne distribucije koristili smo medijan za numeričke varijable, a kod odstupanja od normalne distribucije aritmetičku sredinu. ANOVA (engl. *one-way analysis of variance*) test korišten je za komparaciju srednje vrijednosti dobi majke u vrijeme poroda između različitih genotipova, dok je Kruskal-wallis test korišten za komparaciju srednje vrijednosti fetalne težine između različitih genotipova. Razina statističke značajnosti određena je P vrijednošću manjom od 0,05.

### **3.4. Sustavni pregled literature**

Sustavni pregled literature proveden je u skladu sa smjernicama koje propisuje PRISMA (engl. *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*).

#### **3.4.1. Pretraživanje literature**

Literaturu smo pretraživali u elektroničkim bazama podataka PubMed i Scopus do 01. lipnja 2020. godine. Ograničili smo se na izvorne znanstvene članke na engleskom jeziku o

povezanosti DNA metilacije i PP-a. Ključne riječi korištene za pretraživanje bile su: „DNA methylation“ AND „preterm birth“ i „DNA methylation“ AND „preterm delivery“.

### **3.4.2. Odabir studija**

Istraživanja o povezanosti DNA metilacije i PP-a uključena u sustavni pregled literature određena su prema sljedećim kriterijima: izvorni znanstveni članak napisan na engleskom jeziku u kojem je provedeno i opisano istraživanje u kojem su genotipizirane žene s PP-om i žene kontrole.

### **3.4.3. Izvlačenje podataka**

Podatci koje smo pronašli u tekstu odabranih izvornih znanstvenih članaka i zabilježili u tablice su: autori, godina objave, populacija, broj ispitanica, definicija PP-a, dijagnostički postupci provedeni u žena s PP-om, kriteriji uključivanja/isključivanja u kontrolnu skupinu, korištene molekularno-genetičke metode te rezultati.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Povezanost *MTHFR* C677T i prijevremenih poroda

Distribucija genotipova u skupini žena s PP-om i u skupini kontrola računata HWR-om nije pokazala odstupanja ( $P > 0,05$ ). Učestalost *MTHFR* C677T genotipova i alela u žena s PP-om i žena kontrola prikazana je u tablici 5. U obje skupine najveću učestalost ima heterozigotni (CT) genotip. Nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i frekvenciji alela *MTHFR* C677T SNP-a između žena s PP-om i kontrola.

Tablica 5. Učestalost *MTHFR* C677T genotipova i alela u žena s PP-om i kontrola

<i>MTHFR</i> C677T	PP (N=50) n (%)	Kontrolna skupina (N=50) n (%)	X <sup>2</sup>	P vrijednost
CC	21 (42%)	18 (36%)	0,642	0,726
CT	23 (46%)	27 (54%)		
TT	6 (12%)	5 (10%)		
C	65 (65%)	63 (63%)	0,087	0,768
T	35 (35%)	37 (37%)		

Nadalje, nije pronađena povezanost između navedenog SNP-a i PP-a prema dominantnim, recesivnim i kodominantnim genetičkim modelima. Rezultati prema genetičkim modelima prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Povezanost *MTHFR* C677T i PP-a prema genetičkim modelima

<b>Genetički modeli</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>	<b>P vrijednost</b>
<b>CT+TT/CC</b>	0,78	0,35-1,74	0,539
<b>TT/CT+CC</b>	1,28	0,35-4,32	0,749
<b>TT/CC</b>	1,03	0,27-3,94	0,967
<b>CT/CC</b>	0,73	0,31-1,69	0,463

Naposljetku, nije pronađena ni razlika u učestalosti genotipova ovisno o dobi majke, gestacijskoj dobi i težini nedonoščeta ( $P > 0,05$ ).

## 4.2. Povezanost DNA metilacije i prijevremenih poroda

Prilikom odabira članaka koji zadovoljavaju postavljene kriterije te njihovog uvrštavanja u sustavni pregled literature koristili smo se PRISMA dijagramom toka (Slika 2). Uvjete je zadovoljilo četiri članka te su oni uključeni u kvalitativnu sintezu.

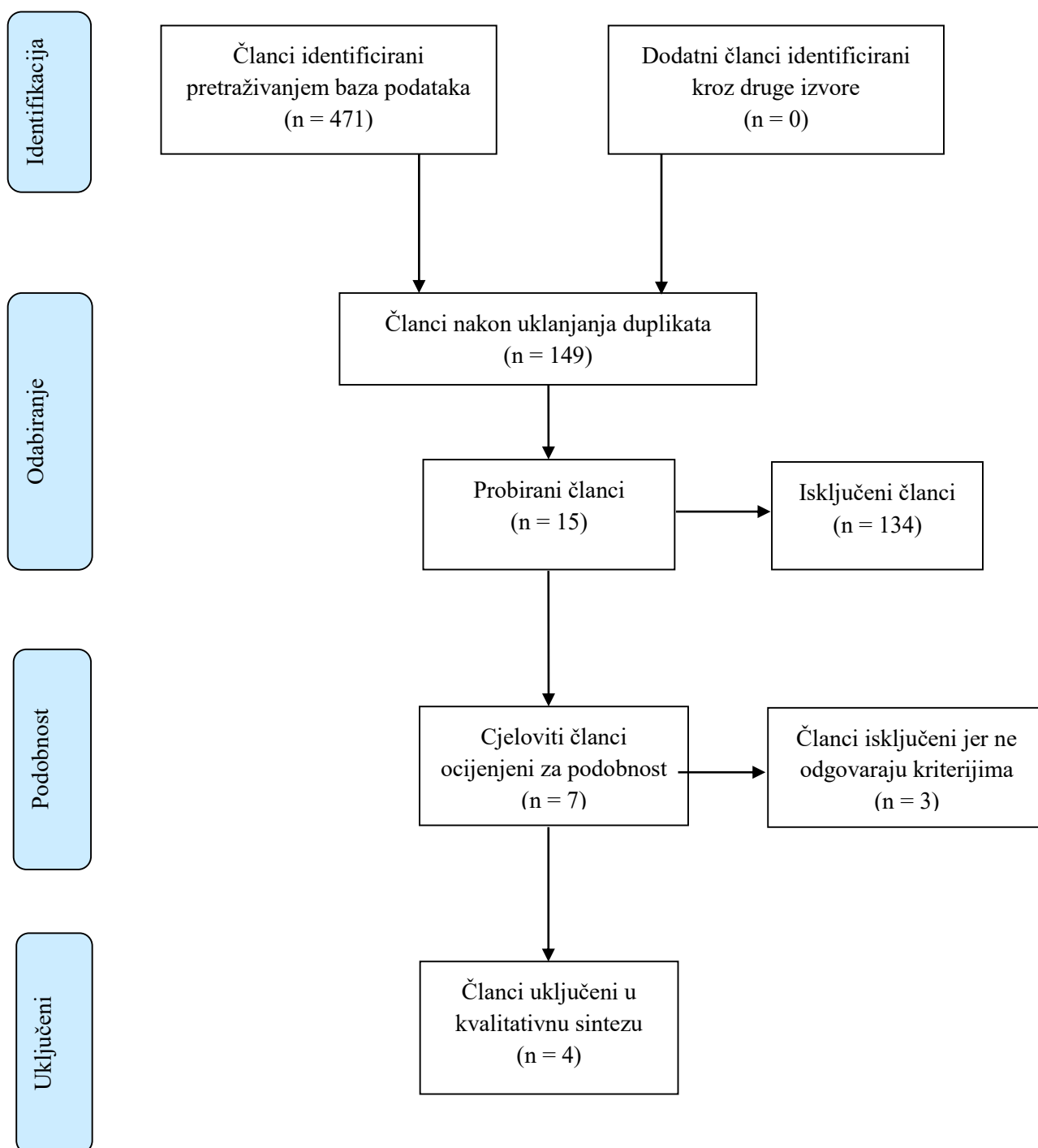
Prvo istraživanje proveli su Hong i suradnici 2018. godine u žena crne rase na području Sjedinjenih Država. U istraživanje je uključeno 300 žena, od kojih je kriterije zadovoljavalo 146 žena s PP-om i 144 žena kontrola. DNA metilacija mjerena je u majčinoj krvi i/ili krvi pupkovine pomoću genomske analize (Illumina HumanMethylation450 BeadChip). Sve žene s trudnoćom postignutom in vitro fertilizacijom, višeploidnom trudnoćom, fetalnim kromosomskim aberacijama i/ili prirođenim anomalijama isključene su iz istraživanja. Rezultati istraživanja pokazali su 45 lokusa DNA metilacije u majčinoj krvi od kojih su dvije regije pokazale statistički značajnu povezanost s grupom ranih PP-a. (30)

Parets i suradnici također su 2015. godine proveli istraživanje u Afroameričkih žena na području Američkih Država. U istraživanje su uključili 16 žena s PP-om i 24 žena kontrola. Iz kontrolne skupine isključene su sve žene s osobnom anamnezom PP-a ili komplikacija u trudnoći, s kirurškim postupcima u vrijeme trudnoće, koje su liječene radi sprječavanja PP-a ili radi suspektne intraamnijske infekcije. Sve ispitanice s višeploidnom trudnoćom ili komplikacijama (preeklampsija, placenta previa, fetalne anomalije itd.) isključene su iz istraživanja. DNA metilacija analizirana je na razini cijelog genoma putem Illumina HumanMethylation450 BeadChip analize. Istraživanje nije pronašlo statistički značajnu asocijaciju u razini DNA metilacije majčine krvi i PP-a. (31)

Wang i suradnici proveli su istraživanje parova 2019. godine u žena podrijetlom iz Kine. U istraživanje su bile uključene 32 žene s PP-om i 16 žena kontrola. Iz istraživanja su isključene sve žene s anamnezom hipertenzije, šećerne bolesti, bolesti štitnjače, anemije i

tuberkuloze ili s komplikacijama u trudnoći (gestacijska hipertenzija, gestacijski dijabetes, fetalne anomalije itd.). DNA metilacija mjerena je genomskom analizom pomoću Illumina HumanMethylation450 BeadChip. Rezultati su pokazali jednu DMR u placenti koja je pokazala statistički značajnu povezanost s PP-om. (9)

Kohortno istraživanje koje su proveli Burris i suradnici 2012. godine jedino je koje je obuhvatilo žene većinski bijele rase (75 %) na području Sjedinjenih Država. Od 2128 žena koje su prvotno bile uključene u istraživanje, praćeno je 1160 žena kojima je analizirana DNA metilacija u venskoj krvi te na krvi pupkovine. DNA metilacija analizirana je koristeći pirosekvenciranje na četiri CpG mjesta u genomu, a korišteni su primeri za LINE-1 sekvence. Rezultati su pokazali povezanost između niskog stupnja LINE-1 metilacije i PP-a. (29)



Slika 2. PRISMA dijagram toka

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Povezanost *MTHFR* C677T i prijevremenih poroda

Ovo istraživanje provedeno je kako bi se utvrdila povezanost između *MTHFR* C677T SNP-a i predispozicije za PP. Razlika u distribuciji genotipova i frekvenciji alela *MTHFR* C677T SNP-a između žena s PP-om i kontrola nije nađena. Jednako tako nije pronađena ni značajna povezanost prema dominantnom, recesivnom i kodominantnim genetičkim modelima. Stoga, rezultati istraživanja koje smo proveli upućuju na to da zamjena citozina timinom na poziciji 677 u egzonu 4 ne povećava rizik od PP-a ni u heterozigotnom ni u homozigotnom obliku.

*MTHFR* C677T SNP povezuje se s predispozicijom za brojna patološka stanja, pri čemu se najčešće spominju kardiovaskularne bolesti (ateroskleroza, kongestivno srčano zatajenje), neurodegenerativne bolesti, karcinomi, gluhoća, itd. (4, 21). S obzirom na to da hiperhomocisteinemija kao posljedica *MTHFR* C677T SNP-a svoj patološki učinak ostvaruje dominantno na krvnim žilama, postavlja se pitanje može li navedena supstitucija povećati rizik od komplikacija u trudnoći (5). Brojna istraživanja i meta-analize temeljila su se na analizi povezanosti između *MTHFR* C677T SNP-a i predispozicije za PP, međutim s različitim rezultatima (5, 8, 16, 18).

Nan i suradnici proveli su istraživanje parova na ukupno 216 žena podrijetlom iz Kine, od kojih je 108 imalo pozitivnu anamnezu PP-a. Njihovi rezultati pokazali su statistički značajno veću učestalost TT homozigotnog genotipa u žena u kojih je prethodno zabilježen PP, u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $P=0,004$ ;  $OR=3,08$ ;  $95\% \text{ CI}=1,47-6,45$ ). Statistički značajna razlika pronađena je i u frekvenciji T alela ( $P=0,002$ ;  $OR=1,85$ ;  $95\% \text{ CI}=1,26-2,72$ ),

što sve ukazuje na značajnu ulogu *MTHFR* C677T homozigotnog genotipa kao rizičnog čimbenika za PP (18).

Slični su rezultati dobiveni u istraživanju koje je provedeno u Indiji pod vodstvom Tiwari i suradnika. Istraživanje je obuhvatilo 209 žena s PP-om i 194 kontrola. Distribucija *MTHFR* C677T SNP-a bila je statistički značajno viša u prvoj skupini i to po svim kategorijama ( $P=0,001$ ). S obzirom na visoku stopu PP-a u sjeveroistočnoj Indiji, *MTHFR* C677T SNP potencijalno bi mogao poslužiti kao rizični čimbenik za PP, loš ishod trudnoće te malu porođajnu težinu i u homozigotnom i u heterozigotnom obliku (8). Slične je rezultate objavilo i jedno od rijetkih istraživanja u bijele rase (5, 33). Unatoč tome, naše istraživanje provedeno na Europskoj populaciji (Hrvatska i Slovenija) pokazalo je oprečne rezultate.

U odnosu na sva ostala istraživanja, zanimljive rezultate objavilo je istraživanje koje su proveli Hwang i suradnici na 226 žena u Koreji, od kojih je 98 imalo pozitivnu anamnezu PP-a, a 128 zdravu trudnoću bez ikakvih komplikacija. U istraživanju je analiziran utjecaj dva SNP-a *MTHFR* gena, C677T i 1298 A/C, na predispoziciju za PP. Dobiveni rezultati pokazali su statistički značajno veću učestalost homozigotnog TT genotipa *MTHFR* C677T SNP-a u kontrola nego u pacijentica s pozitivnom anamnezom PP-a ( $OR=0,54$ , 95 %  $CI=0,32-0,92$ ,  $P=0,023$ ). Nadalje, frekvencija T alela također je bila statistički značajno veća u kontrolnoj skupini ( $P=0,044$ ). Zaključak po istraživanju bio je da TT genotip u korejskih žena djeluje protektivno, odnosno smanjuje rizik od PP-a. S obzirom na dobivene rezultate, Hwang i suradnici smatraju kako unos folata hranom ili suplementima znatno utječe na razinu homocisteina u plazmi i pritom u manjoj ili većoj mjeri poništava učinak *MTHFR* C677T. Sam protektivan učinak na PP potkrjepljuje se činjenicom kako korejska hrana sadrži velike količine folata koje bi posljedično mogle smanjiti razinu homocisteina u plazmi unutar referentnih vrijednosti (9, 16).

Opsežna meta-analiza provedena je sa strane Wu i suradnika. S hipotezom kako *MTHFR* C677T može poslužiti kao rizični čimbenik za PP i malu porođajnu težinu, analizirano je 25 studija. Od toga, osam studija proučavalo je vezu između *MTHFR* C677T nađenog u majke, a tri vezu između istog SNP-a nađenog u nedonoščeta. Studija je obuhvatila žene crne i bijele rase s pozitivnom anamnezom PP-a. Dobiveni rezultati pokazali su vezu između *MTHFR* C677T nađenog u krvi majke s PP-om, prema većini genetičkih modela. Statistički značajna povezanost pokazana je prema frekvenciji alela (T vs. C, OR=1,36, 95 % CI=1,02–1,81), homozigotnom modelu (TT vs. CC, OR=1,70, 95 % CI 1,07–2,68) i recesivnom modelu (TT vs. CT + CC, OR = 1,49, 95 % CI 1,00–2,22), ali ne i dominantnom ili heterozigotnom modelu (5). Daljnja analiza prema etnicitetu otkrila je najznačajniju povezanost TT homozigotnog genotipa i PP-a u žena azijskog podrijetla.

Zanimljivo je kako prevalencija *MTHFR* C677T varira ovisno o etnicitetu i geografskoj lokaciji. Primjerice, TT genotip češći je u bijelaca na područjima Italije i Španjolske, a rjeđi na području Amerike i u crne rase (5). U bijelaca homozigotna mutacija varira na oko 10-14 %, dok je kod hispanijskog podrijetla nešto češća (21-25 %). Japan bilježi postotak TT homozigota na oko 11 %, dok je u osoba crne rase ovaj polimorfizam iznimno rijedak, tek nešto ispod 1 % (13). Iako je jasno kako je učestalost *MTHFR* C677T SNP-a različita ovisno o podrijetlu i lokaciji, čak i uzimajući u obzir navedene čimbenike, rezultati različitih istraživanja još uvijek nisu podudarni. To je potvrdilo i naše istraživanje, kojim smo dobili rezultate oprečne rezultatima istraživanja u drugim bijelim populacijama (5).

Na temelju toga postavlja se pitanje zašto različite studije bilježe različite rezultate neovisno o geografskoj i etnografskoj rasprostranjenosti genotipova i frekvenciji alela. Ključnu ulogu u tome mogla bi imati upravo razina folata i vitamina B skupine u krvi (5, 34).

Folna kiselina i vitamini B skupine (B12, B6 i B2) važni su kofaktori u ciklusu metilacije i metabolizmu homocisteina (34). U normalnom metabolizmu, homocistein prelazi



u metionin u transmetilacijskoj reakciji koju kodira metionin sintaza, za što su potrebni vitamin B12 i folna kiselina (34, 35). Iz toga proizlazi kako je razina homocisteina u plazmi direktno povezana s razinom vitamina B12 i folne kiseline, odnosno da unos nadomjesnih količina navedenih suplemenata smanjuje plazmatsku razinu homocisteina (13, 36, 37). Deficijencija vitamina B jedna je od najčešćih neprepoznatih deficijencija s obzirom na to da većina ljudi nema uravnoteženu i zdravu prehranu i zbog toga ne unosi dovoljno vitamina B skupine. S obzirom na podjednaku važnost folne kiseline i vitamina B skupine u metabolizmu i pretvorbi homocisteina, za nadomjestak funkcije MTHFR enzima potrebno je unositi i jedno i drugo – suplementacija samo folne kiseline neće pomoći ako nije riješen i nedostatak vitamina B (34, 22, 38).

Kang i suradnici proveli su istraživanje u kojem su pronašli dvostruki porast ukupne razine homocisteina u plazmi u pacijenata s razinom folata u serumu ispod referentnih vrijednosti (<2ng/mL). Viša razina homocisteina nađena je i u pacijenata s niskim folatima u plazmi (2,0-3,9 ng/mL) u usporedbi s pacijentima s referentnom razinom folata (5,0-17,9 ng/mL). Pacijenti s granično niskom razinom folata(4,0-4,9 ng/mL) pokazali su granično više razine homocisteina sa srednjom vrijednošću od 5,65 nmol/mL. Kang i suradnici došli su i do korelacije između deficijencije vitamina B12 i hiperhomocisteinemije (36), a slične rezultate objavili su i Liew i suradnici (13). Osim toga, unosom nadomjesnih razina folne kiseline i vitamina B12, razina homocisteina u plazmi počela je padati (36). Perreira i suradnici također su primijetili višu razinu homocisteina u pacijenata s TT genotipom (16,2 u odnosu na 8,2 mmol/L) i niže razine vitamina B12 (39).

Shelnutt i suradnici proveli su 2004. istraživanje kojim su evaluirali utjecaj *MTHFR* C677T SNP-a na globalnu DNA metilaciju u mladih žena koje su konzumirale prehranu s udjelom folata nižim od preporučene dnevne doze. U 7. tjednu studije sve su ispitanice uz početnu prehranu počele uzimati dodatnu supstituciju folne kiseline, čime je unesena dnevna

razina folata iznosila iznad 400mcg. Studija je obuhvatila žene između 20 i 30 godina s TT i CC genotipom. DNA metilacija mjerena je na početku studije te nakon 7. i 14. tjedna. Provedena mjerenja prilikom unosa prehrane s niskim udjelom folata pokazala su redukciju globalne DNA metilacije u usporedbi s prvim mjerenjima. Nakon uvođenja preporučene dnevne doze folata, žene s TT homozigotnim genotipom pokazale su značajno povećanje razine DNA metilacije prilikom replikacije folata nego CC homozigoti (40).

Hiraoka i suradnici također su proveli istraživanje na temu *MTHFR* C677T SNP-a i razine folata u krvi. Osobe s TT homozigotnim genotipom pokazale su značajno višu razinu homocisteina i značajno nižu razinu folata u serumu u usporedbi s CT i TT genotipom. Administracija folne kiseline poništila je te razlike, što također govori u prilog navedenoj teoriji (41).

U prilog navedenom govori i kako je usporedbom dobivenih rezultata u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju pokazana značajna razlika u povezanosti *MTHFR* C677T s PP-om. Razlika između ove dvije skupine mogla bi se bazirati upravo na zakonskoj podlozi u razvijenim zemljama (npr. Kanada, Amerika, Hrvatska) kojom se preporučuje supstitucija folne kiseline u trudnoći, pri čemu se doza povećava kod visokorizičnih trudnoća. Za razliku od toga, zemlje u razvoju poput Kine, koja broji najviše značajnih istraživanja *MTHFR* C677T SNP-a, nemaju istu zakonsku podlogu. Iz toga proizlazi mogućnost kako *MTHFR* C677T SNP povećava rizik od PP-a, ako je unos folne kiseline neadekvatan (5). Pritom bi identifikacija *MTHFR* C677T SNP-a, naročito homozigotnog modela, mogla igrati ključnu ulogu u primarnoj prevenciji PP-a i probiru visokorizičnih trudnoća u zemljama u razvoju. Drugačije rečeno, uvođenjem obavezne suplementacije folne kiseline u toku trudnoće u svim zemljama svijeta moglo bi se utjecati na prevalenciju PP-a.

Iz svega navedenog, postoji mogućnost da se *MTHFR* C677T SNP klinički prezentira kao PP u žena koje su homozigoti za navedeni polimorfizam, ali ne uzimaju nadomjesne

pripravke folne kiseline i vitamina B skupine koje bi mogle spriječiti razvoj PP-a. To bi značilo da će majke koje su homozigoti za navedeni polimorfizam imati veću učestalost PP-a u zemljama u razvoju, nego što će imati majke s jednakim genotipom u razvijenim zemljama, kao što je Hrvatska. Potrebna su daljnja istraživanja na većoj populaciji koja bi razjasnila vezu između *MTHFR* C677T SNP-a i PP-a s obzirom na unos dodatnih količina folata i vitamina B12.

## 5.2. Povezanost DNA metilacije i prijevremenih poroda

Drugi važan faktor koji bi mogao pridonijeti povećanom riziku od PP-a je DNA metilacija. Iako se globalna DNA metilacija već dugo smatra potencijalnim uzrokom brojnih patoloških stanja, napravljeno je vrlo malo istraživanja koja su pokušala povezati metilacijski obrazac DNA majke i rizik od PP-a (9, 29-31). Osim toga, razinu DNA metilacije u genomu mogu reducirati i *MTHFR* SNP-ovi i tako još više doprinijeti u etiopatogenezi brojnih patoloških stanja, između ostalog i PP-a (25).

Utvrđivanje DNA metilacije majčinog genoma kao rizičnog faktora za PP omogućilo bi prepoznavanje visokorizičnih trudnoća na temelju metilacijskog obrasca i upozorilo na potrebu za povećanim nadzorom trudnoće. Ovaj je rad stoga obuhvatio i sustavni pregled svih istraživanja objavljenih na tu temu, u svrhu razjašnjavanja potencijalne veze između DNA metilacije i predispozicije za PP.

DNA metilacija je epigenetički mehanizam kojim se metilna skupina s donora prenosi na citozin koji prethodi (5') gvaninu unutar CpG dinukleotidne sekvence (neidhart, moore). Metilacijom CpG otoka u promotorskoj regiji sprječava se transkripcija, translacija i ekspresija metiliranoga gena (26). Na DNA metilaciju mogu utjecati razni endogeni i

egzogeni čimbenici (npr. prehrana, različiti mikroorganizmi, BMI, stres, socio-ekonomsko okruženje, itd.). Drugim riječima, DNA metilacija pod različitim utjecajima može mijenjati ekspresiju gena i uvjetovati pojavu novih obilježja (ovisno o zahvaćenom genu) zbog čega se sve više proučava njen utjecaj na brojna patološka stanja, uključujući i PP (29, 30).

Istraživanja su provedena na različitim skupinama, putem različitih metoda i s različitim rezultatima. Istraživanje koje su proveli Hong i suradnici identificiralo je 45 lokusa DNA metilacije u majčinoj krvi od kojih su dvije regije pokazale statistički značajnu povezanost s grupom ranih PP-a (<34. tjedan), a koje se nisu mogli objasniti majčinim genskim varijantama, strukturom stanice i/ili gestacijskim komplikacijama. Studija je provedena na 300 žena crne rase. Obje su DMR, locirane u promotorskim regijama *CYTIP* i *LINC00114* gena, pokazale značajniji nivo hipometilacije u žena s pozitivnom anamnezom PP-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Ova bi dva lokusa mogla poslužiti kao biomarker za predispoziciju prema PP-u (hong). Parets i suradnici također su proveli istraživanje na 40 Afroameričkih žena, međutim nisu pronašli značajnu asocijaciju između DNA metilacije majčine krvi i PP. Unatoč tome, otkriveni su podudarajući obrasci metilacije između majki s PP-om i nedonoščadi. Autori su se složili kako je studija mala te kako se u budućnosti treba ponoviti na većem uzorku (31).

Burris i suradnici jedini su proveli istraživanje koje je obuhvatilo većinski bijelu rasu (75%), Rezultati koje su objavili pokazali su poveznicu između niskog stupnja LINE-1 metilacije u krvi majke s PP-om. Iako je ova studija bila veća (n=1160), fokusirala se više na globalnu, nego na tkivno-specifičnu metilaciju (29).

Wang i suradnici istraživali su obrazac DNA metilacije u tkivu placentе i u krvi pupkovine, pri čemu su dokazali jedan DMR u placenti koji je pokazao signifikantnu korelaciju s ishodom PP-a. Metilirana CpG područja u korelaciji s PP-om povezana su s genima koji su pretežno kontrolirali procese poput biološke regulacije i višestaničnih procesa

(npr. odgovor na stimuluse). Istraživanje je provedeno sa zaključkom kako postoji povezanost između DNA metilacije i PP-a (9).

Iz svih navedenih istraživanja jasno je kako su potrebne daljnje, opsežnije studije na raznovrsnijim populacijama da bi se razjasnila veza između statusa DNA metilacije majčinog genoma i rizika od PP-a. Malo je istraživanja analiziralo DNA metilaciju majčinog genoma i većina je provedena među crnom rasom. S obzirom na nekonzistentne rezultate, potrebne su daljnje, opsežnije studije na različitim populacijama da bi se razjasnila veza između statusa DNA metilacije majčinog genoma i rizika od PP-a.

Zasad ne postoje istraživanja koja su utvrdila povezanost između *MTHFR* SNP-ova i razine metilacije, što bi svakako trebalo učiniti u budućnosti. Povezanost između *MTHFR* SNP-ova i razine metilacije nađena je u nekim drugim patološkim stanjima. Pojedinačna istraživanja i tu su pokazala oprečne rezultate što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima koja bi tu povezanost potencijalno razjasnila. Istraživanjem daljnjih epigenetičkih promjena u genomu koje bi mogle poslužiti kao potencijalni biomarkeri predispozicije za PP omogućilo bi se rano prepoznavanje i eventualnu intervenciju kod majki s povećanim rizikom za PP.

## 6. ZAKLJUČAK

Istraživanje koje smo proveli radi utvrđivanja povezanosti između *MTHFR* C677T SNP-a i PP-a nije pokazalo statistički značajne rezultate, a sustavni pregled povezanosti DNA metilacije i PP-a upućuje na to da trenutno nije moguće pružiti nedvosmislene odgovore o ulozi promjene obrasca DNA metilacije kao čimbenika podložnosti za PP.

Nadalje, prema specifičnim ciljevima:

- 1) nisu utvrđene statistički značajne razlike u frekvenciji genotipa i alela *MTHFR* C677T SNP-a između žena s PP-om i žena kontrolne skupine ( $P>0,05$ ),
- 2) nije utvrđena statistički značajna povezanost genotipova i alela *MTHFR* C677T SNP-a s podložnošću za PP prema dominantnom, recesivnom i kodominantnim genetičkim modelima ( $P>0,05$ ),
- 3) nije pronađena razlika u srednjim vrijednostima dobi majke, gestacijskoj dobi i težini nedonoščeta između genotipova *MTHFR* SNP-a ( $P>0,05$ ), i
- 4) sustavnim pregledom literature utvrđena su četiri prethodna izvorna znanstvena istraživanja povezanosti DNA metilacije i PP-a, koji upućuju na to da je DNA metilacija mogući čimbenik rizika za PP, ali nije utvrđen jedinstveni promijenjeni obrazac koji bi mogao poslužiti kao biomarker za PP.

## 7. SAŽETAK

**Cilj:** Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji remetira i odstranjuje homocistein iz organizma, aminokiselinu koja u visokim razinama može dovesti do oštećenja krvnih žila. DNA metilacija je epigenetički mehanizam čija razina ima bitnu ulogu u raznim bolestima. Radi se o promjenama u (epi)genetičkom materijalu koje su međusobno povezane i mogle bi imati utjecaj na tijek trudnoće. Cilj ovog završnog rada bio je istražiti povezanost između *MTHFR* C677T SNP-a jednog nukleotida i prijevremenog poroda (PP) u žena hrvatske i slovenske populacije te provesti sustavni pregled literature o povezanosti između razine DNA metilacije i PP-a.

**Ispitanici i metode:** U naše istraživanje bilo je uključeno 50 žena s PP-om i 50 žena kontrola. Genotipizacija *MTHFR* C677T provedena je kombinacijom polimerazne lančane reakcije (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment-length polymorphism*, RFLP). Sustavni pregled literature izvršen je pomoću baza podataka PubMed i Scopus, a odabrani su izvorni znanstveni članci na engleskom jeziku.

**Rezultati:** Nisu utvrđene statistički značajne razlike u frekvenciji genotipa i alela *MTHFR* C677T između žena s PP-om i žena kontrolne skupine, po nijednom genetičkom modelu. Pretraživanjem literature pronađeno je četiri članka koja su istraživala povezanost DNA metilacije s PP-om, ali s oprečnim rezultatima.

**Zaključak:** *MTHFR* C677T ne povećava predispoziciju za PP u žena europske populacije. Na temelju provedenog sustavnog pregleda literature i oprečnih rezultata ne mogu se donijeti konačni zaključci o ulozi *MTHFR* C677T polimorfizma jednog nukleotida i DNA metilacije kao čimbenika podložnosti za PP. Potrebna su dodatna istraživanja.

**Ključne riječi:** DNA metilacija; genetički polimorfizmi; *MTHFR* C677T; prijevremeni porod

## 8. SUMMARY

**Aim:** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an enzyme important for remethylation of homocysteine, a toxic amino acid that can lead to the damage of blood vessels. DNA methylation is an epigenetic mechanism with a significant role in many diseases. Both are associated with various pathological conditions and could also have an essential role during pregnancy. We tried to determine the connection between *MTHFR* C677T polymorphism and preterm birth (PTB) in Croatian and Slovenian women and conducted a systematic review on the role of DNA methylation as a predisposing factor for PTB.

**Patients and methods:** In our case-control study we included 50 women with PB and 50 control women. The *MTHFR* C677T polymorphism was identified using the combination of polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). We used PubMed and Scopus to search for original scientific articles in English.

**Results:** We found no statistically significant difference in the frequency of *MTHFR* C677T polymorphism between the women with PTB and the control women. Also, no association was detected under all genetic models. We identified four articles that studied the association between DNA methylation and PTB in the literature search, with different results.

**Conclusion:** The *MTHFR* C677T polymorphism is not a predisposing factor for PTB in Croatian and Slovenian women. Based on our systematic review, there is no conclusive connection between DNA methylation and PTB. Additional studies are needed.

**Key words:** DNA methylation; genetic polymorphism; *MTHFR* C677T; preterm birth



## 9. LITERATURA

1. Who.int [Internet]. Geneva: World Health Organisation; ažurirano 19.2.2018. Dostupno na: <https://www.who.int/>
2. Quinn JA, Munoz FM, Gonik B, Frau L, Cutland C, Mallett-Moore T, et al. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine*. 2016; 34(49): 6047-56.
3. Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK, Driscoll AK. Births: Final Data for 2018. *National Vital Statistics Reports* 2019; 68(13).
4. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018; 52: 3-12.
5. Wu H, Zhu P, Geng X, Liu Z, Cui L, Gao Z et al. Genetic polymorphism of MTHFR C677T with preterm birth and low birth weight susceptibility: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2017; 295(5): 1105-18.
6. Strauss JF 3rd, Romero R, Gomez-Lopez N, et al. Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(3):294-314.e2
7. Beck S, Wojdyla D, Say L, Pilar Betran A, Merialdi M, Harris Requejo J, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ*. 2010; 88(1): 31-8.
8. Tiwari D, Bose PD, Das S, Das CR, Datta R, Bose S. MTHFR (C677T) polymorphism and PR (PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: A Northeast Indian population based study. *Meta Gene*. 2015; 3: 31-42.

9. Wang XM, Tian FY, Fan LJ, Xie CB, Niu ZZ, Chen WQ. Comparison of DNA methylation profiles associated with spontaneous preterm birth in placenta and cord blood. *BMC Med Genomics*. 2019; 12(1): 1.
10. Barišić A, Pereza N, Kolak M, Peterlin A, Tul N, Krpina MG, et al. Gene polymorphisms of DNA methyltransferases in women with spontaneous preterm birth. *CMJ* 2020; 61(1): 8-17.
11. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014; 345(6198): 760-5.
12. Knight AK, Smith AK. Epigenetic Biomarkers of Preterm Birth and Its Risk Factors. *Genes (Basel)*. 2016; 7(4): 15.
13. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*. 2015; 58(1): 1-10.
14. PubMed Gene [Internet]. MTHFR methylenetetrahydrofolate reductase [Homo sapiens (human)]; ažurirano 21.1.2020. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
15. Chen H, Yang X, Lu M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in China: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 293(2): 283-90.
16. Hwang IW, Kang YD, Kwon BN, Hong JH, Han SH, Kim JS et al. Genetic variations of MTHFR gene and their association with preterm birth in Korean women. *Medicina (Kaunas)*. 2017; 53(6): 380-5.
17. Fang Q, Jiang Y, Liu Z, Zhang Z, Zhang T. Systematic review and meta-analysis of the associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and preterm delivery. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018; 44(4): 663-72.

18. Nan Y, Li H. MTHFR genetic polymorphism increases the risk of preterm delivery. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(6): 7397-402.
19. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999; 81(2): 165-76.
20. Song Y, Li B, Wang C, Wang P, Gao X, Liu G. Association between 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Gene Polymorphism and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016; 25(3): 679-87.
21. Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch Pharm Res.* 2018; 41(4): 372-83.
22. Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet.* 2011; 378(9791): 584-94.
23. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood.* 2004; 104(10): 3046-51.
24. Alizadeh S, Djafarian K, Moradi S, Shab-Bidar S. C667T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene and susceptibility to myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2016; 217: 99-108.
25. Nash AJ, Mandaviya PR, Dib MJ, Uitterlinden AG, van Meurs J, Heil SG, et al. Interaction between plasma homocysteine and the MTHFR c.677C > T polymorphism is associated with site-specific changes in DNA methylation in humans. *FASEB J.* 2019; 33(1): 833-43.

26. Neidhart M. DNA Methylation and Complex Human Disease, 1st edition [Internet]. Elsevier Inc. 2015. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13028-0>.
27. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38(1): 23-38.
28. Baba Y, Yagi T, Sawayama H, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, et al. Long Interspersed Element-1 Methylation Level as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancers. *Digestion*. 2018; 97(1): 26-30.
29. Burris HH, Rifas-Shiman SL, Baccarelli A, Tarantini L, Boeke CE, Kleinman K, et al. Associations of LINE-1 DNA Methylation with Preterm Birth in a Prospective Cohort Study. *J Dev Orig Health Dis*. 2012; 3(3): 173-81.
30. Hong X, Sherwood B, Ladd-Acosta C, Peng S, Ji H, Hao K, et al. Genome-wide DNA methylation associations with spontaneous preterm birth in US blacks: findings in maternal and cord blood samples. *Epigenetics*. 2018; 13(2): 163-72.
31. Parets SE, Conneely KN, Kilaru V, Menon R, Smith AK. DNA methylation provides insight into intergenerational risk for preterm birth in African Americans. *Epigenetics*. 2015; 10(9): 784-92.
32. Pennell CE, Jacobsson B, Williams SM, Buus RM, Muglia LJ, Dolan SM, et al. Genetic epidemiologic studies of preterm birth: guidelines for research. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 196(2): 107-18.
33. Engel SM, Olshan AF, Siega-Riz AM, Savitz DA, Chanock SJ. Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195(5): 1231.e1-2311.
34. GeneFood [Internet]. The Science of MTHFR “Mutations” Explained; ažurirano 30.9.2019. Dostupno na: <https://www.mygenefood.com>.

35. Fowler B. Disorders of homocysteine metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 1997; 20(2): 270-85.
36. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988; 43(4): 414-21.
37. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(1): 47-53.
38. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA.* 2001; 286(18): 2236.
39. Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta.* 2004; 340(1-2): 99-105.
40. Shelnutt KP, Kauwell GP, Gregory JF 3rd, Maneval DR, Quinlivan EP, Theriaque DW, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem.* 2004; 15(9): 554-60.
41. Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y. Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 316(4): 1210-6.
42. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry.* 2018;8(1):242

## 10. ŽIVOTOPIS

Roberta Šverko rođena je 28. listopada 1995. godine u Rijeci. Pohađala je Osnovnu školu „Vazmoslav Gržalja“ Buzet te završila opću gimnaziju u Buzetu. Paralelno sa srednjoškolskim obrazovanjem završila je govorničku školu „Ivo Škarić“ i stekla diplomu iz govorništva te volontirala u Gradskom društvu Crvenog križa Buzet. Dobitnica je Nagrade Grada Buzeta.

U srpnju 2014. godine upisala se na studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom studija dodijeljena su joj dva dekanova priznanja za izvrsnost, na akademskoj 2016./2017. i 2018./2019. godini, za prosjek ocjena 5,0. U 2016. godini postaje demonstratorica na Katedri za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, a od 2017. preuzima i dužnost glavne demonstratorice, koju obnaša tri godine zaredom.

Sudjelovala je u razmjeni studenata. Kolovoz 2018. provela je na odjelu neurokirurgije u bolnici Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz u Madridu, a 2019. mjesec je dana boravila u Japanu, na odjelu kardiovaskularne kirurgije bolnice Nippon u Tokiju. Volontirala je i na Klinici za anesteziologiju i intenzivno liječenje KBC Rijeka te na odjelima raznih kirurških grana. U slobodno vrijeme bavi se grafičkim dizajnom pa je tako 2020. ilustrirala nastavni priručnik „Slagalica nasljeđa“ na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku (priručnik za opismenjavanje iz Medicinske genetike, izdavač Medicinski fakultet u Rijeci).