

A miRNS-99a expressziója anyai perifériás vérben magzati szívfejlődési rendellenességek esetében



Kehler Lars, Biró Orsolya, Lázár Levente dr., Hajdú Julianna dr., Balogh Sára dr., Rigó János Jr. dr., Nagy Bálint dr.

Semmelweis Egyetem, I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest
(igazgató: Rigó János Jr.dr., egyetemi tanár)

ÖSSZEFOGLALÁS

Cékitűzés: A napjainkban alkalmazott prenatális szűrővizsgálatok biokémiai markerek vizsgálatán és az ultrahang vizsgálatokon alapulnak. A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (VSzR) szűrésére napjainkban nem áll a rendelkezésünkre megbízható biomarker. A mikroRNS-ek (miRNS) több, a szívfejlődés folyamatában résztvevő gén expresszióját is befolyásolják. Vannak köztük olyanok, amelyek kimutathatóak az anyai keringésben, ezáltal potenciális biomarkerként szolgálhatnak. A kutatás keretében a *miR-99a* miRNS expresszióját vizsgáltuk anyai plazma mintákban.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatok elvégzéséhez 37 várandós nőtől gyűjtöttünk perifériás vérmintát. A betegcsoportot 20 olyan várandós alkotta, akiknek a magzata VSzR-ben szenvedett, a kontrollcsoportot 17 egészséges magzatot hordozó várandós alkotta. Az anyai plazmamintákból miRNS extrakciót végeztünk, majd a cDNS szintézist követően RT-PCR módszerrel meghatároztuk a *miR-99a* koncentrációját.

Eredmények: A két csoport plazmamintáiban mért össz-miRNS koncentrációkban ($5,54 \pm 1,99$ ng/ μ l vs. $6,40 \pm 1,69$ ng/ μ l) nem mutatkozott szignifikáns különbség. A *miR-99a* expressziós analízise során azt tapasztaltuk, hogy az lényegesen nagyobb koncentrációban van jelen a beteg gyermeket hordozó várandósok plazmamintáiban: $0,0178 \pm 0,0353$ ng/ μ l vs. $0,0011 \pm 0,0035$ ng/ μ l ($p < 0,05$).

Következtetések: Eredményeink szerint a *miR-99a* miRNS valószínűleg részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában. A miRNS rendellenes expressziója szívfejlődési rendellenesség jelenlétére utal, és ennek köszönhetően alkalmazható lehet a betegség noninvasív prenatális markereként.

KULCSSZAVAK

mikroRNS, veleszületett szívfejlődési rendellenesség, noninvasív prenatális diagnosztika

Lars Kehler, Orsolya Biró, Levente Lázár MD, Julianna Hajdu, MD, Sára Balogh, MD, János Rigó jr., MD, Bálint Nagy, MD.

Hsa-miR-99a levels in maternal plasma in case of fetal congenital heart defects

ABSTRACT

Introduction: The current standard prenatal screening is mostly based on biochemical marker tests and the use of ultrasonography to determine the health status of the fetus. There is no secure stand-alone screening marker for congenital heart defects (CHDs). Micro-RNAs (miRNAs) are associated with cardiogenesis which enter the maternal peripheral bloodstream during pregnancy and allow for non-invasive prenatal testing (NIPT). This study investigated the plasma expression profile of fetal hsa-miR-99a in maternal blood.

Materials and methods: Peripheral blood samples were collected from 41 pregnant women, comprising 24 with CHD-positive fetuses and 17 with CHD-free controls. MiRNAs were isolated from maternal serum and quantitative real-time PCR was carried out to determine the expression of hsa-miR-99a.

Results: While the miRNA concentrations were almost the same in the affected and control groups (5.54 ng/ μ L vs. 6.40 ng/ μ L), we found significantly up-regulated hsa-miR-99a levels in the affected group (0.0178 \pm 0,0353 ng/ μ L vs. 0.0011 \pm 0,0035 ng/ μ L, $p < 0.05$)

Conclusion: According to our study, hsa-miR-99a is likely to be involved in cardiac malformation and serves a distinguished regulatory purpose during fetal development, and therefore presents as an intriguing candidate for monitoring cardiomyogenesis and potential use as a NIPT-biomarker for fetal CHD.

KEY WORDS

Micro-RNA, congenital heart defects, non-invasive prenatal diagnosis

BEVEZETÉS

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (VSzR) a leggyakoribb veleszületett fejlődési rendellenességek közé tartoznak, az élve születések körülbelül 1%-ában fordulnak elő [1]. A rendellenességek korai felismerése lehetővé teszi a házaspár felkészülését és a betegség prognózisának korai megítélését és bizonyos esetekben a megszületést követő műtétekre történő felkészülést.

A perinatális elhalálozások 20%-ában valamilyen fejlődési rendellenesség tehető felelőssé. Az újszülöttkori esetek mintegy 28%-ában, az első 2-12. hónap során bekövetkező halálozások 50%-ában van szerepe a szív hibás fejlődésének [2,3]. A betegséggel sújtott újszülöttek több mint felének kritikus az állapota és legtöbbször sebészeti beavatkozásra van szükségük [4,5]. Gyakoriak az oxigenizációs zavar által kiváltott másodlagos következmények, mint például az idegrendszer károsodása [6]. Az American Heart Association (AHA) szerint a súlyos szívfejlődési rendellenességek több mint felénél, az enyhébb formák esetén 25%-os eséllyel fordul elő idegrendszeri érintettség [7].

A VSzR szűrési módszere a magzati echokardiográfia. A vizsgálat optimális időpontja a 18-20. terhességi hét. Az ultrahangot végző szakorvos szakképzettségétől nagyban függ a módszer hatékonysága [8]. A nagy tapasztalattal rendelkező vizsgálók esetében a vizsgálat szenzitivitása eléri a 90%-ot, ugyanakkor az átlagos detekciós ráta ettől jóval alacsonyabb [9, 10].

A szív fejlődési rendellenességeinek kiszűrésében szintén fontos szerepe van az első trimeszteri kiterjesztett

ultrahang szűrővizsgálatnak [11]. A vizsgálatot a 11-13. terhességi héten végzik. A vizsgálat része a magzati tarkódó (NT), valamint egyébek között a magzati szív vizsgálata. A módszer megbízhatósága több paramétertől is függ, mint például a megfelelő „cut-off” érték meghatározása és az előzőekhez hasonlóan, a vizsgáló orvos felkészültsége [12,13]

Az elmúlt évtizedekben összefüggést mutattak ki a terhesség alatt vizsgált egyes szérumszintű markerek és a veleszületett szívhibák megjelenése között: az emelkedett szintű β -hCG és a csökkent szintű PAPP-A a betegség jelenlétére utal [14]. Az előbbi markereket rutinszerűen alkalmazzák a Down szindróma szűrésére, ugyanakkor ezen biomarkerek specifitása VSzR-ek esetében nem standardizált [15].

Az elmúlt években a perinatális diagnosztikai kutatások központjában az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak állnak. Fő források a méhlepény trophoblastsejtjeinek apoptózisa, mely sejtek a terhesség alatt folyamatos kapcsolatban állnak az anyai vérkeringéssel. A szabad nukleinsavak vérvétel útján hozzáférhetőek, vizsgálatuk nem jelent a magzatra veszélyt.

Azok a mikroRNS-ek (miRNS), amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a lepényben, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben is. Számos olyan található közöttük, amely a részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel [16,17]. Az ilyen tulajdonságokkal rendelkező, magzati eredetű miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában [18].

1. táblázat Össz-miRNS koncentráció a beteg- és kontroll csoportban

Össz-miRNS koncentráció (ng/ μ l)	Beteg csoport (n = 22)	Kontroll csoport (n = 17)
Átlag (\bar{x})(\bar{x})	5,54	6,40
Szórás (σ)(σ)	1,99	1,69
Medián (m)(m)	5,50	5,90

2. táblázat miR-99a koncentráció a beteg- és kontroll csoportban

miR-99a koncentráció (ng/ μ l)	Beteg csoport (n = 22)	Kontroll csoport (n = 17)
Átlag (\bar{x})(\bar{x})	1,78 $\times 10^{-2}$	1,08 $\times 10^{-3}$
Szórás (σ)(σ)	3,53 $\times 10^{-2}$	3,54 $\times 10^{-3}$
Medián (m)(m)	6,44 $\times 10^{-3}$	0,00 $\times 10^{-3}$

A miRNS-ek rövid 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló RNS molekulák. Fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének expressziójának poszttranszkripciószabályozásában. Becslések szerint a humán genom több mint 1000 miRNS-t kódol, és a fehérje gének körülbelül 1/3-a miRNS-szabályozás alatt áll [19,20]. Hatásukat negatív reguláció révén fejtik ki: az mRNS szekvenciák nem transzlálódó végéhez (3'UTR) kötődve gátolják annak transzlációját [21].

A miRNS-eket kódoló gének a genom intra- és intergénikus régióiban találhatóak. A legtöbb esetben a fehérjét kódoló gének intronikus szakaszain lokalizálódnak, amelyek a transzkripció során kivágódnak az mRNS előalakból. Ezek a miRNS gének a kódoló exonokkal azonos, „értelmes” DNS szálon helyezkednek el, és mivel önálló promóterrel nem rendelkeznek, ezért „gazda” génnel együtt íródnak át. A miRNS-eket kódoló gének kisebb része önálló transzkripciószegységként működik, ezek a genom nem kódoló, intergénikus régióiban találhatóak [22].

Különböző állatmodelleken végzett kísérletek alapján elmondható, hogy a miRNS-ek által szabályozott útvonalak hibáinak következtében súlyos fejlődési rendellenességek és/vagy korai elhalálozás következhet be [23]. A miRNS-ek érésehez szükséges Dicer enzim hiányában (loss-of-function mutáció, knock out) zavar lép fel a korai és késői embriogenezisben valamint sejtdifferenciálódási folyamatokban [24]

A munkánk során célkitűzésünk volt a *mir-99a* miRNS szerepének tanulmányozása a szívfejlődési rendellenességekben. Ennek keretében expressziós vizsgálatokat végeztünk anyai plazma mintákban, a későbbi klinikai alkalmazás megalapozása céljából.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatok elvégzéséhez 37 várandóstól gyűjtöttünk perifériás vérmintát. A beteg csoportot 20 olyan várandós alkotta, akiknél a magzati echokardiográfia szívfejlődési rendellenességet mutatott. A kontroll csoportot 17 egészséges magzatot hordozó anya alkotta, akiknél a rutin szülészeti ultrahang vizsgálat során nem mutatkozott kóros eltérés. A beteg csoportban a várandósok átlag életkora 30,82±5,8, a kontroll csoportban 32±5,11 év volt. A vizsgálatok elvégzésekor a terhességi kor a beteg csoportban 21,12±4,56, a kontroll csoportban 21,18±5,93 hét volt. A vizsgált terhesek kardiológiai státusza normál volt.

VÉRVÉTEL ÉS PLAZMA ELVÁLASZTÁS

Az anyai perifériás vérmintákat 2×9 mL-es EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük. A vérmintákból *Eppendorf*

5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) típusú centrifuga segítségével elválasztottuk a plazmát. A mintákat 10 percig 2,500 rpm fordulatszámon, majd a leszívott felüliszót 10 percig 15,500 rpm fordulatszámon centrifugáltuk 4°C-on. Az így nyert plazmamintákat 1,5mL-es *Eppendorf* csövekben, -80°C-on tároltuk a további feldolgozásig.

MIRNS EXTRAKCIÓ

Háromszáz mikroliter plazmából miRNS extrakciót végeztünk a *NucleoSpin® miRNA Plasma (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország)* kit felhasználásával, a gyártó leírásának megfelelően. A kapott minták össz-miRNS koncentrációját *Nanodrop* spektrofotométer (*Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA*) segítségével határoztuk meg. A plazmából, vagy szérumból történő izolálás monitorizálásához úgynevezett spike kontrollt használunk, mert a *Nanodrop*kal való meghatározás nem elég pontos.

REVERZ TRANSZKRIPCIÓ ÉS KVANTITATÍV RT-PCR

A miRNS minták reverz transzkripcióját a *miScript® II RT Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország)* felhasználásával végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően.

A RT-PCR reakciók kivitelezéséhez a *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I* kitet (*Roche Ltd., Penzberg, Németország*) használtuk. A reakciót a *miR-99a* miRNS-re és a kontroll *u6* snRNS-re specifikus primerekkel (*miRCURY LNA™ PCR primer set, Exiqon A/S, Vedbæk, Dánia*) hajtottuk végre, a gyártó leírásának megfelelően. A *miR-99a* miRNS target szekvenciája: 5'-AACCCGUA GAUCCGAUCUUGUG-3'. A globin gén hígítási sora (15, 1,5, 0,15, 0,015 ng/μl) segítségével standard görbét készítettünk, mely alapján kiszámítottuk a *miR-99a* és a kontroll *u6* snRNS pontos mennyiségét. Az utóbbit az adatok normalizálásához alkalmaztuk. A globin gén meghatározása a pontos koncentrációk kiszámításához volt szükséges a hígítási sornál kapott C_i értékek alapján.

STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az eredményeket átlag±szórás formában adtuk meg. A statisztikai elemzéseket az Excel 2011 14.4.6 (*Microsoft, Seattle, USA*) verziójával végeztük el. A csoportok közötti eltérések statisztikai szignifikanciáját a Student-féle t-próbával számoltuk ki, szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéket vettük.

EREDMÉNYEK

Össz-miRNS koncentráció

Az összes mintában az átlagos össz-miRNS koncentráció $5,92 \pm 1,89$ ng/μl volt. A kontroll mintákban átlagosan $6,40 \pm 1,69$ ng/μl, a betegekben pedig $5,54 \pm 1,99$ ng/μl koncentrációt mértünk (1. sz. Táblázat). Nem volt szignifikáns különbség a két csoport plazma mintáiban mért össz-miRNS koncentrációkban.

A miR-99a expressziója anyai plazma mintákban

Az összes mintában az átlagos *miR-99a* miRNS koncentráció $1,05 \times 10^{-2} \pm 2,76 \times 10^{-2}$ ng/μl volt. A kontroll mintákban átlagosan $1,08 \times 10^{-3} \pm 3,54 \times 10^{-3}$ ng/μl, a betegekben pedig $1,78 \times 10^{-2} \pm 3,53 \times 10^{-2}$ ng/μl koncentrációt mértünk (2. sz. Táblázat). *A miR-99a* expressziója szignifikánsan magasabb volt beteg minták esetében ($p < 0,05$).

MEGBESZÉLÉS

A vizsgálataink során meghatároztuk a *miR-99a* miRNS expresszióját anyai plazma mintákban, amely lényegesen magasabb a beteg gyermeket hordozó várandósok esetében.

Hasonló jellegű kutatást végeztek Lázár és mtsai, és azt tapasztalták, hogy a *let-7c* miRNS szintén fokozottan fejeződik ki a VSzR-es magzatot hordozó várandósok keringésében [25]. A két miRNS egy klaszterben helyezkedik a 21-es kromoszóma hosszú karján (21q21.1), és ez magyarázhatja a megfigyelt változásokat.

Coppola és mtsai kísérletesen bizonyították, hogy a *miR-99a/let-7c* miRNS klaszter részt vesz a cardiomyogenesis finomhangolásában, hatásukat epigenetikai faktorok szabályozása révén fejtik ki [26]. A kutatás keretében elvégezték a két miRNS expressziós vizsgálatát Down-szindrómás magzatok szívszövet mintáin, és a plazma mintákban megfigyeltekhez hasonló expressziós szintemelkedést tapasztaltak.

Egy három évnél fiatalabb szívdefekttussal sújtott gyermek kezelési költségei 10-20-szorosa is lehet egy ugyanolyan korú, szívét tekintve egészséges gyermeknek [27]. Connor és mtsai megfigyelései szerint a kezeléssel járó költségek a család mindennapjait nagyban megnehezítik, továbbá folyamatos lelki megpróbáltatásoknak vannak kitéve [28].

Az ultrahang vizsgálat képminősége jelentősen csökken túlsúllyal rendelkező várandósok esetében. A túlsúlyos várandósok aránya növekedő tendenciát mutat, Franciaországban körülbelül 10%, az Amerikai Egyesült Államokban pedig meghaladja a 28%-ot is [29, 30]. Ebből kifolyólag nagy az igény az olyan biomarkerekre, amelyek

ket a magzati szívuultrahanggal kombinálva kiszűrhetőek a magas kockázatú várandósok és növelhető a vizsgálat tálatati pontossága.

Az embrionális fejlődés során az elsőként kialakuló szervek között van a szív [31]. A magzati szív-és érrendszer fejlődése különböző transzkripció faktorok irányítása alatt áll, melyek a szignál transzdukciós jelátviteli rendszerek utasításait a génexpresszió szabályozásán keresztül valósítják meg. Ha a hálózat valamely eleme károsodik, például mutáció által, szívfejlődési rendellenesség alakulhat ki [32]. A fejlődési rendellenességek a szív különböző részeit érinthetik és a kis eltérésektől (minor anomáliák) a halálos kimenetelt okozó formákban is jelentkezhetnek [33].

Az elmúlt években számos olyan specifikus miRNS-t azonosítottak, melyek részt vesznek a szívfejlődés folyamatának szabályozásában. Ezek közé tartozik a széles körben tanulmányozott izomspecifikus *miR-1/miR-133* klaszter, melynek tagjai ellentétes hatást fejtenek ki a kardiogenezis folyamán: a *miR-1* elősegíti az epithelium sejtek szívizomsejteké váló differenciációját, míg a *miR-133* gátolja ugyanezt a folyamatot [34,35]. Az úgynevezett „myomiR”-ok (*miR-208a*, *miR-208b* és *miR-499*) nevüket az őket kódoló myosin génekről kapták. Olyan folyamatok finomhangolásában vesznek részt, mint a kardiális remodelling és az izomrostok myosin koncentrációjának meghatározása [36].

A *miR-99a* miRNS-t eddig leginkább onkológiai kutatások részeként vizsgálták, habár született néhány olyan tanulmány is, ahol a miRNS szívfejlődésbeni szerepét taglalták. A legtöbb cikk a myocardialis infarktus után bekövetkező gyógyulási folyamatokra összpontosít, amelyek során a *miR-99a* fokozottan expressziót mutat. Vizsgálataink alapján eenek amiRNS-nek az expressziója lényegesen megnőtt a beteg gyermeket hordozó várandósok keringésében. További, nagyobb csoporton végzett vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a miRNS szívfejlődésben játszott szerepét megerősítsük, és hogy a későbbiekben a veleszületett szívfejlődési rendellenességek egy lehetséges biomarkere legyen.

Érdekltségi nyilatkozat:

A szerzőnek nincsenek érdekltségei.

IRODALOM

- [1] Bernier P-L, Stefanescu A, Samoukovic G, et al. The challenge of congenital heart disease worldwide: epidemiologic and demographic facts. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu.* 2010;13:26-34.

- [2] *Rosano A, Botto LD, Botting B, et al.* Infant mortality and congenital anomalies from 1950 to 1994: an international perspective. *J Epidemiol Community Health.* 2000;54:660-666.
- [3] *Yang Q, Chen H, Correa A, et al.* Racial differences in infant mortality attributable to birth defects in the United States, 1989-2002. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006;76:706-13.
- [4] *Moller JH, Taubert K A., Allen HD, et al.* Cardiovascular health and disease in children: current status. A Special Writing Group from the Task Force on Children and Youth, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89:923-930.
- [5] *Dearani JA, Mavroudis C, Quintessenza J, et al.* Surgical advances in the treatment of adults with congenital heart disease. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:565-572.
- [6] *Hoffman JI.* The global burden of congenital heart disease. *Cardiovasc J Afr.* 2013;24:141-145.
- [7] *Marino BS, Lipkin PH, Newburger JW, et al.* Neurodevelopmental outcomes in children with congenital heart disease: evaluation and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;126:1143-72.
- [8] *Rasiab S V, Publicover M, Ewer A K, et al.* A systematic review of the accuracy of first-trimester ultrasound examination for detecting major congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;28:110-116.
- [9] *Tegnander E, Eik-Nes SH.* The examiner's ultrasound experience has a significant impact on the detection rate of congenital heart defects at the second-trimester fetal examination. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;28:8-14.
- [10] *Friedberg MK, Silverman NH, Moon-Grady A J, et al.* Prenatal Detection of Congenital Heart Disease. *J Pediatr.* 2009;155:26-31.
- [11] *Bruns RF, Moron AF, Murta CGV, et al.* The role of nuchal translucency in the screening for congenital heart defects. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87:307-14.
- [12] *Wald NJ, Morris JK, Walker K, et al.* Prenatal screening for serious congenital heart defects using nuchal translucency: a meta-analysis. *Prenat Diagn.* 2008;28:1094-104.
- [13] *Clur S-AB, Bilardo CM.* Early detection of fetal cardiac abnormalities: how effective is it and how should we manage these patients? *Prenat Diagn.* 2014.doi:10.1002/pd.4466.
- [14] *Sheifa S, Amargandhi M, Bhupendra J, et al.* First trimester Maternal Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and free β -hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28:3-12.
- [15] *Jelliffe-Pawłowski LL, Walton-Haynes L, Currier RJ.* Using second trimester ultrasound and maternal serum biomarker data to help detect congenital heart defects in pregnancies with positive triple-marker screening results. *Am J Med Genet A.* 2008;146A:2455-2467.
- [16] *Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G.* MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics.* 2008;341:239-242.
- [17] *Boettger T, Braun T.* A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development. *Circ Res.* 2012;110:1000-13.
- [18] *Hahn S, Holzgreve W, eds.* *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood.* Basel: KARGER; 2001. doi:10.1159/000062532.
- [19] *Lewis BP, Burge CB, Bartel DP.* Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120:15-20.
- [20] *Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19:92-105.
- [21] *Liang Y, Ridzon D, Wong L, et al.* Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics.* 2007;8:166. doi:10.1186/1471-2164-8-166.
- [22] *Chen J, Wang D-Z.* microRNAs in cardiovascular development. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:949-957.
- [23] *Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* 2003;35:215-217.
- [24] *Kanellopoulou C, Muljo S.* Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 2005;19:489-501.
- [25] *Lazar L, Biro O, Rigo J Jr., Nagy B.* Let-7c as potential maternal serum miRNA biomarker in fetal congenital heart defects. *Biomedical Papers* 2014;158:S8.
- [26] *Coppola A, Romito A, Borel C, et al.* Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res* 2014;12:323-337.
- [27] *Boulet SL, Grosse SD, Riehle-Colarusso T, et al.* Health care costs of congenital heart defects. In: Wyszynski DF, Correa-Villaseñor A, Graham TP, eds. *Congenital Heart Defects: From Origin to Treatment.* New York, NY: Oxford University Press; 2010:493-501.

- [28] Connor JA, Kline NE, Mott S, et al. The meaning of cost for families of children with congenital heart disease. *J Pediatr Health Care.* 2009;24:318-325.
- [29] Fuchs F, Houllier M, Voulgaropoulos a, et al. Factors affecting feasibility and quality of second-trimester ultrasound scans in obese pregnant women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:40-46.
- [30] Weichert J, Hartge DR. Obstetrical sonography in obese women: a review. *J Clin Ultrasound.* 2011;39:209-216.
- [31] Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev.* 2003;17:1937-1956.
- [32] Chen J-F, Murchison EP, Tang R, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:2111-2116.
- [33] Sempere L, Freemantle S. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal. *Genome Biol.* 2004;5:R13. doi:10.1186/gb-2004-5-3-r13.
- [34] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005;436:214-220.
- [35] Chen J, Mandel E, Thomson J, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2005;38:228-233.
- [36] Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:2772-2786.

Levelezési cím:

Dr. Nagy Bálint
Szemmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati
Klinika
1088 Budapest, Baross u. 27.
E-mail: nagy.balint@noi1.sote.hu