

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA KRAŠOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA KRAŠOVEC

**RAZLIKE V ODZIVU NA FOLNO KISLINO IN
5-METILTETRAHIDROFOLAT
GLEDE NA SPREMEMBE GENOV FOLATNEGA CIKLA**

**DIFFERENCES IN RESPONSE TO FOLIC ACID AND
5-METHYLTETRAHYDROFOLATE DEPENDING
ON CHANGES IN THE FOLATE CYCLE GENES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm. Naloga je del raziskave Javne agencije za raziskovalno delo Republike Slovenije z naslovom Analiza bioloških označevalcev presnove folatov za ugotavljanje ogroženosti s prirojenimi razvojnimi napakami, projekt J3-5507. Vodja projekta: prof. dr. Ksenija Geršak, dr. med.

ZAHVALA

Ob tej priložnosti se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Nataši Karas Kuželički, mag. farm., za strokovno pomoč, nasvete in potrpežljivost med izdelavo magistrske naloge. Posebna zahvala tudi mladi raziskovalki Maši Vidmar, mag. lab. biomed., za pomoč pri praktičnem delu magistrske naloge in za vse strokovne nasvete ter spodbudne besede v času izdelave magistrske naloge.

Zahvala gre ne nazadnje tudi moji družini in prijateljem, ki so vseskozi verjeli vame in mi stali ob strani.

»Iucundi acti labores.«

M. Tullius Cicero

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm.

Vesna Krašovec

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
POVZETEK	IX
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1. UVOD	1
1.1 FOLATI IN FOLNA KISLINA	1
1.1.1 KEMIJSKA STRUKTURA IN VIRI	1
1.1.2 METABOLIZEM IN TRANSPORT FOLATA	2
1.1.2.1 Absorpcija in privzem v celice	2
1.1.2.2 Metabolizem folata znotraj celic	3
1.1.3 KATABOLIZEM IN IZLOČANJE FOLATOV	5
1.1.4 BIOKEMIČNA VLOGA FOLATOV	5
1.1.4.1 Sinteza nukleotidov	6
1.1.4.2 Metilacija bioloških molekul	6
1.2 POMANJKANJE FOLATA	6
1.2.1 VPLETENOST FOLATOV V NASTANEK OFC	7
1.3 GENETSKI POLIMORFIZMI V PRESNOVNI POTI FOLATOV	7
1.3.1 POLIMORFIZMI V <i>MTHFR</i> GENU	7
1.3.1.1 Polimorfizem <i>MTHFR</i> c.677C>T	8
1.3.1.2 Polimorfizem <i>MTHFR</i> c.1298A>C	8
1.3.2 POLIMORFIZMI V <i>MTRR</i> GENU	8
1.3.3 POLIMORFIZMI V <i>MTHFD1</i> GENU	8
1.3.4 POLIMORFIZMI V <i>BHMT</i> GENU	9

1.3.5 POLIMORFIZMI V <i>GNMT</i> GENU	9
1.3.6 POLIMORFIZMI V <i>DNMT3B</i> GENU	9
1.3.7 POLIMORFIZMI V <i>FPGS</i> GENU.....	10
1.3.8 POLIMORFIZMI V <i>DHFR</i> GENU	10
1.3.9 POLIMORFIZEM V <i>SLC19A1</i> GENU.....	10
1.4 OROFACIALNE SHIZE	11
1.4.1 RAZVOJ IN NASTANEK OFC	11
1.4.2 DELITEV IN KLASIFIKACIJA OFC	12
1.4.3 FUNKCIONALNE POSLEDICE OFC	13
1.5 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK OFC.....	14
1.5.1 DEMOGRAFSKI DEJAVNIKI.....	14
1.5.2 OKOLJSKI DEJAVNIKI.....	14
1.5.3 GENETSKI DEJAVNIKI.....	15
2. NAMEN	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 PREISKOVANCI IN POTEK ŠTUDIJE	18
3.2 TEST ZA DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS	19
3.2.1 Materiali in oprema	19
3.2.2 MTS TEST – TESTIRANJE LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ S FOLNO KISLINO IN 5-METILTETRAHIDROFOLATOM	20
3.3 IZOLACIJA DNA.....	20
3.3.1 Izolacija DNA iz limfoblastoidnih celičnih linij.....	21
3.3.1.1 Materiali in oprema.....	21
3.3.2 Izolacija DNA iz brisov ustne sluznice	22
3.3.2.1 Materiali in oprema.....	22
3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA	22

3.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	23
3.5.1 Materiali in oprema	23
3.5.2 Genotipizacija s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami	24
3.5.3 Genotipizacija z analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti ob uporabi SimpleProbe® tehnologije	28
3.6 STATISTIČNA ANALIZA	31
3.6.1 REZULTATI MTS TESTA	31
3.6.2 ANKETNI VPRAŠALNIK.....	31
3.6.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	31
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
4.1 ŠTUDIJA METABOLNE AKTIVNOSTI LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ Z RAZLIČNIMI KOMBINACIJAMI POLIMORFIZMOV V GENIH FOLATNEGA CIKLA	32
4.2 ŠTUDIJA PAROV OTROK Z OFC IN ZDRAVIH SOROJENCEV	47
4.2.1 OKOLJSKI DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OFC.....	47
4.2.2 GENETSKI DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OFC.....	53
5. SKLEPI	66
6. LITERATURA IN VIRI	68
7. PRILOGE.....	i

KAZALO SLIK

Slika 1 (prirejeno po 5): Struktura folne kisline (FA) in v naravi prisotnih folatov. THF = tetrahidrofolat.	2
Slika 2 (prirejeno po 11): Prikaz vstopa folatov v celico, poliglutamacije folata in redukcije folata (ozadje obarvano zeleno), prikaz presnove folatov znotraj celice (ozadje obarvano rumeno) in prikaz remetilacijskega cikla (ozadje obarvano vijolično).	5
Slika 3 (prirejeno po 51): Shematski prikaz normalne anatomske strukture orofacialnega področja (zgoraj) in različni tipi enostranskih ali obojestranskih shiz primarnega neba (CL) ali/in sekundarnega neba (CP, CLP) (spodaj).	13
Slika 4 (prirejeno po 82): Princip genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami TaqMan®.	25
Slika 5: Grafični prikaz alelna diskriminacije za polimorfizem DHFR rs1677693. X-os predstavlja fluorescentno barvilo FAM TM , y-os pa barvilo VIC®. Z modro barvo so prikazani homozigoti za mutirano zaporedje (AA), z rdečo heterozigoti (AC), z zeleno homozigoti za nemutirano zaporedje (CC).	27
Slika 6 (prirejeno po 84): Shematski prikaz delovanja SimpleProbe® probe v primeru: A) SimpleProbe® proba v reakcijski mešanici prosta, B) SimpleProbe® proba, vezana na tarčno DNA.	28
Slika 7: A) Različne talilne krivulje pri različnih genotipih za SLC19A1 rs1051266. Modra krivulja prikazuje homozigote za nemutirano zaporedje (GG), zelena krivulja prikazuje homozigota za mutirano zaporedje (AA), heterozigota (AG) prikazuje rdeča krivulja. B) Različni talilni vrhovi pri različnih genotipih za SLC19A1 rs1051266. Moder talilni vrh ima T _m pri 53,92 °C in prikazuje homozigota GG; zeleni talilni vrh ima T _m pri 63,92 °C in prikazuje homozigota AA; rdeča talilna vrhova prikazujeta heterozigota GA.	29
Slika 8: Stolpični diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 1516 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline ali 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.	32
Slika 9: Stolpični diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 1823 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.	33
Slika 10: Stolpični diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 6037 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.	33

Slika 11: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 380 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.....	34
Slika 12: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 388 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.....	34
Slika 13: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 5876 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.	35
Slika 14: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFR 677.....	37
Slika 15: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFR 1298.....	38
Slika 16: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFR (predvidena encimska aktivnost > 60 % in < 60 %).	39
Slika 17: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTRR.	40
Slika 18: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFD1.	41
Slika 19: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa BHMT.....	42
Slika 20: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa GNMT.....	43

Slika 21: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa DNMT3B.....	44
Slika 22: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa FPGS.....	45
Slika 23: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa DHFR.....	46
Slika 24: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa SLC19A1.	46
Slika 25: Stolpični diagram prikazuje razporeditev MTHFR 677 genotipa, aditivno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojcih.	54
Slika 26: Stolpični diagram prikazuje razporeditev MTHFR 677 genotipa, dominantno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojcih.	54
Slika 27: Stolpični diagram prikazuje razporeditev MTHFR 1298 genotipa, aditivno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojcih.	55
Slika 28: Stolpični diagram prikazuje razporeditev GNMT genotipa, aditivno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojcih.	56
Slika 29: Stolpični diagram prikazuje razporeditev GNMT genotipa, dominantno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojcih.	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Genetski profili folatnega cikla izbranih šestih limfoblastoidnih celičnih linij (LCL). Mutirani aleli so prikazani z modro barvo.	19
Preglednica II: Uporabljeni testni kompleti TaqMan®	25
Preglednica III: Sestava PCR – reakcijske mešanice enega vzorca	26
Preglednica IV: Program izvedbe PCR s TaqMan® sondami.....	26
Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice enega vzorca za PCR in HRM analizo.....	30
Preglednica VI: Program izvedbe PCR in HRM analize	30
Preglednica VII: Prikaz srednjih vrednosti preučevanih numeričnih spremenljivk in rezultatov osnovne statistične analize.	48
Preglednica VIII: Prikaz števila in frekvenc izidov v posameznih kategorijah preučevanih kategoričnih spremenljivk okoljskih dejavnikov tveganja za OFC ter prikaz rezultatov osnovne statistične analize.....	52
Preglednica IX: Prikaz števila in frekvenc genotipov za preučevane polimorfizme (aditivni model in MTHFR encimska aktivnost) ter rezultati osnovne statistične analize.	57
Preglednica X: Prikaz števila in frekvenc genotipov za preučevane polimorfizme (recesivni model).....	58
Preglednica XI: Prikaz števila in frekvenc genotipov za preučevane polimorfizme (dominantni model).	58

POVZETEK

Folat je pomemben vitamin skupine B kompleksa in je nujno potreben za sintezo deoksiribonukleinske kisline (DNA), kar ima odločilni pomen pri rasti in razvoju celic v normalnem embrionalnem razvoju. Folna kislina ima kompleksno presnovo, njen učinek pa je odvisen od koncentracije aktivne oblike 5-metiltetrahidrofolata. Pomanjkanje folne kisline v času nosečnosti zaradi genetskih in okoljskih dejavnikov lahko privede do razvoja prirojenih napak ploda. Polimorfizmi genov folatnega cikla so v splošni populaciji zelo pogosti. Namen magistrske naloge je bil ugotoviti, ali so prisotne razlike v odzivu na folno kislino in 5-metiltetrahidrofolat med različnimi genotipi izbranih polimorfizmov folatnega cikla, kar bi lahko imelo pomen pri preprečevanju prirojenih napak, npr. orofacialnih shiz (ang. *orofacial clefts*, OFC). Za preučevanje vpliva izbranih polimorfizmov (*MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131, *MTRR* rs1801392, *MTHFD1* rs2236225, *BHMT* rs3733890, *GNMT* rs10948059, *DNMT3B* rs2424913, *FPGS* rs1544105, *DHFR* rs1677693 in *SLC19A1* rs1051266) na nastanek orofacialnih shiz smo uporabili 44 parov otrok s shizo in njihovih zdravih sorojencev. Vpliv demografskih in okoljskih dejavnikov smo preučili s pomočjo anketnega vprašalnika, ki ga je izpolnilo 122 mater otrok z orofacialno shizo in njihovih zdravih sorojencev. Genotipe zdravih sorojencev in otrok z orofacialno shizo smo določili s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami, razen za genotip *SLC19A1* rs1051266, kjer smo uporabili analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti ob uporabi SimpleProbe® tehnologije. Ugotovili smo, da starost matere in letnica rojstva (vrstni red rojstva otroka) statistično značilno vplivata na razvoj orofacialne shize. Matere, ki imajo v prvem trimesečju povišano telesno temperaturo nad 38 °C, poročajo o nerednem jemanju folatnih pripravkov pred nosečnostjo in med njo ter o jemanju drugih zdravil, imajo povečano tveganje za razvoj orofacialne shize pri otroku. Statistično značilne razlike smo ugotovili v frekvencah genotipov *MTHFR* 677 (rs1801133), *MTHFR* 1298 (rs1801131) in *GNMT* (rs1094059) med sorojenci z in brez orofacialne shize. Vpliv izbranih polimorfizmov na odziv na folate smo preučevali na 6 limfoblastoidnih celičnih linijah (LCL). Na metabolno aktivnost izbranih limfoblastoidnih celičnih linij vpliva koncentracija folatov in genotipi *MTHFR*, *MTRR*, *GNMT*, *DNMT3B*, *DHFR* ter *SLC19A1*. Med genotipom in koncentracijo folatov je bila prisotna statistično značilna interakcija za naslednje gene: *MTHFR*, *GNMT*, *DNMT3B*, *DHFR* in *SLC19A1*.

KLJUČNE BESEDE: orofacialne shize, polimorfizmi, folna kislina, 5-metiltetrahidrofolat.

ABSTRACT

Folate is an important B-group vitamin and essential for deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis during the normal embryonic development. Folic acid has a complex metabolism and its effect depends on the concentration of its active form 5-methyltetrahydrofolate. Its deficiency during pregnancy caused by genetic and environmental aetiology may lead to birth defects. Polymorphisms in folate genes are common in general population. The aim of this Master's thesis was to examine differences in response to folic acid and 5-methyltetrahydrofolate between different genotypes of selected folate cycle genes. The results might help prevent developmental anomalies, e.g. orofacial clefts (OFC). 44 pairs of children with orofacial clefts and their healthy siblings were examined to determine the influence of selected polymorphisms on orofacial clefts formation: *MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131, *MTRR* rs1801392, *MTHFD1* rs2236225, *BHMT* rs3733890, *GNMT* rs10948059, *DNMT3B* rs2424913, *FPGS* rs1544105, *DHFR* rs1677693 and *SLC19A1* rs1051266. We also investigated the influence of demographic and environmental risk factors using the questionnaire, which was filled in by 122 mothers of children with orofacial clefts and their healthy sibling. Genotypes of healthy siblings were determined by TaqMan® hydrolysis probes, whereas *SLC19A1* rs1051266 genotype was determined by High resolution melting analysis using SimpleProbe® technology. Statistically, mother's age and birth order have an impact on orofacial clefts. Increased risk of orofacial clefts was observed in mothers that experienced the fever (above 38 °C) in the first trimester, those, who report low or medium compliance of folate supplements before and during pregnancy, and those, who are taking prescription drugs. Statistically significant differences were found in frequencies of *MTHFR* 677, *MTHFR* 1298 and *GNMT* genotypes between sibling pairs with and without orofacial clefts. The influence of selected polymorphisms on response to folates was studied on 6 limfoblastoid cell lines (LCL). Metabolic activity from selected limfoblastoid cell lines was influenced by folate concentration and *MTHFR*, *MTRR*, *GNMT*, *DNMT3B*, *DHFR* and *SLC19A1* genotypes. Statistically significant interaction between genotype and folate concentration was present for *MTHFR*, *GNMT*, *DNMT3B*, *DHFR* and *SLC19A1* genes.

KEY WORDS: orofacial clefts, polymorphisms, folic acid, 5-methyltetrahydrofolate.

SEZNAM OKRAJŠAV

AF	alelska frekvenca
ATP	adenozin trifosfat
B12	kobalamin
BHMT	betainhomocistein metiltransferaza
BHMT	gen za betainhomocistein metiltransferazo
CHD	prirojene srčne napake (ang. <i>congenital heart disease</i>)
CL	razcep ustnice (ang. <i>cleft lip</i>)
CLP	razcep ustnice in neba (ang. <i>cleft lip and plate</i>)
CP	razcep neba (ang. <i>cleft plate</i>)
DHF	dihidrofolat
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DHFR	gen za dihidrofolat reduktazo
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNMT3B	DNA(citozin-5-)-metiltransferaza-3 β
DNMT3B	gen za DNA(citozin-5-)-metiltransferazo-3 β
dTMP	deoksitimidin monofosfat
dUMP	deoksiuridin monofosfat
FA	folna kislina
FPGS	folilpoliglutamat sintetaza
FPGS	gen za folilpoliglutamat sintetazo
FR	folatni receptor
FRET	resonančni prenos energije s fluorescenco (ang. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GNMT	glicin-N-metiltransferaza
GNMT	gen za glicin-N-metiltransferazo
HRM	analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti (ang. <i>high resolution melting analysis</i>)
LCL	limfoblastoidne celične linije
MTHFD1	metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1
MTHFD1	gen za metilentetrahidrofolat dehidrogenazo 1
MTHFR	metilentetrahidrofolat reduktaza
MTHFR	gen za metilentetrahidrofolat reduktazo

MTR	metionin sintaza
MTRR	metionin sintaza reduktaza
MTRR	gen za metionin sintaza reduktazo
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
MTX	metotreksat
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADHP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NTD	napake nevralne cevi (ang. <i>neural tube defects</i>)
OFC	orofacialne shize (ang. <i>orofacial clefts</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PES	fenazin etil sulfat
SAH	S-adenozil-homocistein
SAHH	S-adenozil-homocistein hidrolaza
SAM	S-adenozil-metionin (ang. <i>S-adenosyl-methionine</i>)
SES	socialno-ekonomski status (ang. <i>social economic status</i>)
SLC19A1	folatni prenašalec
SLC19A1	gen za folatni prenašalec
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
THF	tetrahidrofolat
Tm	temperatura taljenja (ang. <i>melting temperature</i>)

1. UVOD

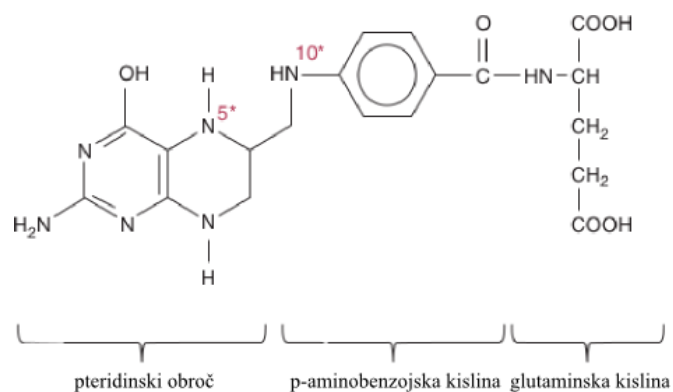
1.1 FOLATI IN FOLNA KISLINA

Folat je pomemben vitamin skupine B kompleksa in ima v naši prehrani pomembno vlogo tako pri sintezi deoksiribonukleinske kisline (DNA) kot tudi pri vzdrževanju celičnih metilacijskih reakcij. Folat je leta 1931 odkrila Lucy Wills v ekstraktih kvasovk. Poimenovanje folna kislina je bilo prvič uporabljeno, ko so substanco izolirali leta 1939 iz špinačnih listov (lat. *folium*, list) (1).

1.1.1 KEMIJSKA STRUKTURA IN VIRI

Folat je vodotopen vitamin B₉, zgrajen iz aromatskega pteridinskega obroča, *p*-aminobenzojske kisline in molekule glutaminske kisline (Slika 1). Reducirano obliko vitamina B₉, ki se nahaja v hrani in bioloških tkivih, v literaturi imenujejo folat. Izraz folna kislina se uporablja za poimenovanje oksidirane oblike vitamina B₉, ki je prisotna v prehrabnih dodatkih in živilih, obogatenih s folatom. Folna kislina je v kristalizirani obliki rumeno-oranžno obarvana. Nestabilna je ob prisotnosti svetlobe, kisika, ekstremnih pH vrednosti in (razen v suhi obliki) tudi pri višjih temperaturah. Pri sesalcih je folat esencialen vitamin za rast in razvoj organizma, ki ga je treba vnesti s hrano. Sesalci, kljub temu da so sposobni sintetizirati vse sestavne dele, folata niso sposobni sintetizirati sami (*de novo*). Saj pteridinskega obroča ne morejo konjugirati z ostalimi enotami tako kot bakterije in višje rastline (2, 3). Glavni naravni vir folatov v hrani so predvsem zelena listnata zelenjava (špinača, solata, brokoli), stročnice, žitarice, nekatere vrste sadja (avokado, guava, mango, pomaranča, granatno jabolko), gobe in nekatere vrste mesa (drobovina, jetra, pljuča). Surova hrana vsebuje višje koncentracije folata v primerjavi s kuhano, saj se del folatov izgubi med procesom obdelave (3). V naravi prisotni folati spadajo v skupino poliglutamatov, ki se med sabo razlikujejo po oksidacijskem stanju (5-metiltetrahidrofolat in 10-metil-tetrahidrofolat) in vezanih substituentih na pteridinskem obroču (4).

Izraz folna kislina se v večji meri uporablja za poimenovanje stabilnejše sintetične oblike vitamina, prisotne v prehranskih dopolnilih in obogatenih živilih. Gre za oksidirano obliko folata z vezano eno molekulo glutaminske kisline, ki ima večjo stabilnost in biološko uporabnost v primerjavi s folati, prisotnimi v hrani (4). V biološkem smislu je tetrahidrofolat (THF) najaktivnejša oblika folata v telesu (6).



Koencim	Substituent na:	
	N-5	N-10
5-formilTHF	-HCO	-H
5,10-metenilTHF	=CH-	
5,10-metilenTHF	-CH ₂ -	
5-metilTHF	-CH ₃	
10-formilTHF	-H	-HCO
THF	-H	-H
Folna kislina	-H	Nil

Slika 1 (prirejeno po 5): Struktura folne kisline (FA) in v naravi prisotnih folatov. THF = tetrahidrofolat.

Priporočen dnevni vnos folatov (ang. *recommended dietary allowance*, RDA) za odrasle je 400 µg, za noseče ženske in doječe matere pa 400-600 µg (6, 7). Priporočena količina vnosa folata za otroke je preračunana ob upoštevanju telesne mase, biološke uporabnosti in potreb zaradi rasti. Priporočena količina vnosa folata za otroke prve starostne skupine 1–4 let je 200 µg/dan; od 4–9 let 300 µg/dan in od 10–18 let 400 µg/dan (2).

1.1.2 METABOLIZEM IN TRANSPORT FOLATA

1.1.2.1 Absorpcija in privzem v celice

V biokemijski poti razgradnje folata sodelujejo številni encimi, ki imajo vlogo akceptorja ali donorja funkcionalne skupine z enim ogljikovim atomom. Med kofaktorji so prisotni vitamini B, še posebej vitamin B₆ in vitamin B₁₂. Molekule folata so hidrofilne in za prehod v celico potrebujejo pomoč transportnih proteinov. V hrani prisotni folati se nahajajo pretežno v obliki poliglutamata in ne morejo prehajati celične membrane. Encim glutamat karboksipeptidaza II (GPC II) katalizira hidrolizo poliglutamata do monoglutamata in omogoči absorpcijo skozi črevesno sluznico v kri preko reduciranih folatnih prenašalcev (RFC). Izkoristek absorpcije je v povprečju okoli 50-odstoten (10–90 %) (2, 4). Absorpcija

monoglutamatne oblike folata poteka predvsem v dvanajstniku in srednjem delu tankega črevesa in je najučinkovitejša v pH območju med 5 in 6.

Prehod aktivne oblike folata, 5-metiltetrahidrofolata, iz krvnega obtoka v celice je možen na dva načina: s folatnimi receptorji (FR) ali reduciranim folatnim prenašalcem 1 (SLC19A1). Del folatov pa lahko preide pasivno s procesom difuzije (8). FR- β in FR- γ imata manjšo afiniteto do 5-metiltetrahidrofolata v primerjavi s FR- α in SLC19A1. SLC19A1 deluje kot anionski antiporter in ima višjo afiniteto za transport reduciranih oblik folatov (prisotni v hrani) (9).

Plazemske vrednosti folata so med 10 in 30 nM, večinoma v prosti obliki, nekaj folata pa je v krvi lahko vezanega na proteine z nizko afiniteto (albumin). Eritrociti vsebujejo višje vrednosti folatov v primerjavi s plazemsko koncentracijo, običajno 50–100 nM. Zaloga folatov se oblikuje med samim procesom eritropoeze in ostane nespremenjena skozi življenjski cikel eritocitov zaradi vezave na hemoglobin. Koncentracija folatov v krvnem obtoku se uporablja za oceno trenutne preskrbe, za oceno dolgoročne preskrbe pa se uporablja koncentracija folatov v eritrocitih. Največ folata znotraj tkiv se nahaja v mitohondriju in citosolu celic (2).

1.1.2.2 Metabolizem folata znotraj celic

Folatni metabolizem je sestavljen iz številnih metabolnih poti z več kot tridesetimi vpletenimi encimi (Slika 2). Po prehodu folatov v celice pride do poliglutamacije in redukcije pteridinskega obroča do koencimsko aktivne tetrahidrofolne oblike (FH₄), podaljšanja glutamatne verige preko reakcij pteridinske verige in oksidacije ali redukcije C enot na N-5 in/ali N-10 mestih. V krvi so folati prisotni izključno v monoglutamatni obliki, ki lahko prehaja celično membrano. Znotraj celic encim folilpoliglutamat sintetaza (FPGS) monoglutamatni obliki doda do 7 molekul glutaminske kisline in jo preoblikuje nazaj v poliglutamato. Gre za od ATP odvisno reakcijo in celični mehanizem zadrževanja folatov znotraj celic. Poleg tega folati v poliglutamati obliki predstavljajo boljši substrat, ker imajo večjo afiniteto do encimov v nadaljnji poti metabolizma folatov (10).

Dihidrofolat reduktaza (DHFR) katalizira redukcijo folne kisline ali dihidrofolata do tetrahidrofolata (THF) (2, 8).

C1-THF-sintaza ali metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1 (MTHFD1) je encimski kompleks, ki ima tri encimske aktivnosti: 10-formil-THF sintetazo,

5,10-metilentetrahidrofolat karboksilatno in 5,10-metilentetrahidrofolat dehidrogenazno (2, 8).

5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je poglavitni encim folatnega metabolizma. Ireverzibilno katalizira pretvorbo 5,10-metilen-tetrahidrofolata do 5-metiltetrahidrofolata, ki je osnovna oblika folata v telesu. Produkt 5-metiltetrahidrofolat ciklično prispeva metilno skupino za oblikovanje metionina (2, 8).

Timidilat sintaza (TS) sodeluje pri *de novo* sintezi deoksitimidin monofosfata (dTMP). TS katalizira proces *de novo* sinteze dTMP iz deoksiuridin monofosfata (dUMP), kot vir metilne skupine služi 5,10-metilen-tetrahidrofolat, pri tem nastane dihidrofolat (DHF). **Dihidrofolat reduktaza (DHFR)** nato DHF reducira nazaj do THF (2, 8).

Metionin sintaza (MTR) katalizira remetilacijo homocisteina do metionina preko prenosa metilne skupine iz 5-metiltetrahidrofolata na homocistein. Reakcija, ki jo katalizira MTR, zagotovi metionin za nadaljno produkcijo univerzalnega donorja metilne skupine; S-adenozil-metionina (ang. S-adenosyl-methionine, SAM). Kobalamin (B12) je kofaktor encima MTR. Medtem ko je MTR encim vsesplošno prisoten, se v jetrih in ledvicah izraža še en encim, ki je del homocisteinskega remetilacijskega sistema, **betain homocistein metiltransferaza (BHMT)**, ki kot donor metilne skupine uporablja betain (2, 8).

Encim **metionin sintaza reduktaza (MTRR)** je tesno povezan z MTR, saj z reduktivno metilacijo njegovega kobalaminskega kofaktorja ohranja MTR aktivnost (2,8).

Cistationin- β -sintaza (CBS) in cistationin- γ -liaza (CTH) katalizirata ireverzibilen razpad homocisteina do cisteina ob prisotnosti vitamina B₆. CBS katalizira kondenzacijo homocisteina in serina do cistationina. CTH katalizira hidrolizo cistationina do cisteina in β -ketobutirata (2, 8).

organizma nujno potrebni. Sodelujejo pri sintezi aminokislin (serin, histidin, glicin) in nukleotidov ter pri oblikovanju primarnega donorja metilne skupine SAM.

1.1.4.1 Sinteza nukleotidov

V procesu sinteze DNA folati sodelujejo v oblikah: 5,10-metilen-tetrahidrofolata, 5,10-metenil-tetrahidrofolata in 10-formil-tetrahidrofolata. 5,10-metenil-tetrahidrofolat in 10-formil-tetrahidrofolat sodelujeta v procesu *de novo* sinteze purinov. 10-formil-tetrahidrofolat prispeva ogljikov atom C2; 5,10-metenil-tetrahidrofolat pa prispeva ogljikov atom C8 purinskega obroča. Ključno vlogo vira metilne skupine pri metilaciji dUMP do dTMP ima 5,10-metilen-tetrahidrofolat. Lahko pa deluje kot donor metilne skupine v procesu sinteze serina in glicina. Sinteza purinov in dTMP je ključnega pomena za nadaljnjo sintezo novih molekul DNA med celično delitvijo (10).

1.1.4.2 Metilacija bioloških molekul

S prispevanjem metilne skupine 5-metiltetrahidrofolat sodeluje pri remetilaciji homocisteina do metionina. Regeneracija metionina je izjemno pomembna za normalen potek metilacijskih reakcij, saj metionin prevzame vlogo substrata za sintezo S-adenozil-metionina (SAM). SAM je univerzalni donor metilne skupine za reakcije metilacije različnih bioloških molekul, kot so: DNA, RNA, nevrottransmitorji, lipidi in proteini (histoni) (12). Reakcije katalizirajo celične metiltransferaze, kot sta na primer **glicin-N-metiltransferaza (GNMT)** in **DNA(citozin-5-)-metiltransferaza-3 β (DNMT3B)**. SAM se po odcepitevi metilne skupine pretvori v S-adenozil-homocistein (SAH), ki je kompetitivni inhibitor številnih metiltransferaz, tudi MTHFR. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) in metionin sintaza (MTR) sta glavna katalizna encima metabolizma SAH. Encim SAH hidrolaza pretvori SAH do homocisteina in adenzina (5, 10). Zmanjšan vnos folatov se lahko odrazi z zmanjšano dostopnostjo prostih funkcionalnih skupin z enim ogljikovim atomom, kar lahko vodi v homocisteinemijo, kopičenje homocisteina. Prav tako kopičenje SAH in pomanjkanje SAM vodi do hipometilacije DNA (5, 10, 12).

1.2 POMANJKANJE FOLATA

Številni dejavniki vplivajo na status preskrbe telesa s folati. Pomanjkanje folata je največkrat povezano s pomanjkljivim vnosom zaradi neuravnotežene prehrane, lahko pa so vpleteni tudi številni drugi mehanizmi, življenjski slog, jemanje zdravil, polimorfizmi v genih za encime folatnega cikla. Zaradi zelo pomembne vloge folatov v DNA sintezi, popravilu in metilaciji je vzdrževanje ustrezne količine intracelularnega folata ključnega pomena za

zagotavljanje ustrezne celične delitve in proliferacije. Rezultat pomanjkanja je neustrezna biosinteza molekul DNA in RNA, ki se lahko odraža v zmanjšani celični delitvi, nestabilnosti dednega materiala in povečani mutagenizi (2, 4, 8). Klasični simptom pomanjkanja folata v človeškem telesu je megaloblastna anemija. Zmanjšano koncentracijo serumskega ali plazemskega folata spremlja povišana vrednost serumskega ali plazemskega totalnega homocisteina. Raziskave abnormalni folatni status s povišanim totalnim homocisteinom povezujejo z različnimi vrstami rakavih obolenj, Downovim sindromom, kardiovaskularnimi, nevrodegenerativnimi (demenca, Alzheimerjeva bolezen) in psihičnimi obolenji (depresija) (9, 13, 14). Pri nosečnicah lahko pride do spontanega splava ali razvoja prirojenih motenj ploda, kot so: orofacialna shiza (OFC), napake zapiranja nevralne cevi (ang. *neural tube defects*, NTD) in prirojenih srčnih napak (ang. *congenital heart disease*, CHD) (2, 4, 8).

1.2.1 VPLETENOST FOLATOV V NASTANEK OFC

Folati so nujno potrebni za sintezo DNA in RNA in imajo poglavitno vlogo pri rasti ter razvoju celic in tkiv. Ne zadosten vnos folatov kot tudi motnja v presnovi ali transportu folata lahko povzročijo pomanjkanje omenjenega vitamina v organizmu. Ne zadostno uživanje folata pred in med nosečnostjo povezujemo s povečanim tveganjem za nastanek prirojenih napak ploda, še posebej NTD. Dokazano je bilo, da folna kislina zmanjša tveganje za nastanek NTD (15), kar pa je vodilo v hipotezo, da k razvoju OFC prispeva pomanjkanje folata oziroma njegove funkcije v organizmu.

1.3 GENETSKI POLIMORFIZMI V PRESNOVNI POTI FOLATOV

Ugotovitev, da je pojavnost OFC povezana s pomanjkljivim uživanjem folatov, je osvetlila področje vpletenosti genskih polimorfizmov encimov presnovne poti folatov na folatni status in pojavnost OFC. S povečanim tveganjem za OFC na podlagi opisanega fenotipa in genotipa povezujejo kar 26 različnih genov (16).

1.3.1 POLIMORFIZMI V *MTHFR* GENU

Gen za *MTHFR* (17 kb) se nahaja na krajši ročici kromosoma 1, na mestu 1p36.3, in je sestavljen iz 11 eksonov, velikosti od 102 bp do 432 bp. Znanih je več polimorfizmov *MTHFR* gena, ki vplivajo na stabilnost in aktivnost encima. V genu *MTHFR* je

identificiranih več kot 40 točkovnih mutacij, najbolj raziskana in pogosta polimorfizma sta locirana le 2,1 kb narazen: c.677C>T (AF(T) = 37 %) in c.1298A>C (AF(C) = 31 %) (17).

1.3.1.1 Polimorfizem *MTHFR* c.677C>T

Polimorfizem gena *MTHFR* c.677C>T (rs1801133, Ala222Val) se nahaja v delu, ki kodira katalitično domeno encima MTHFR. Zamenjava citozina s timinom na mestu 677 povzroči zamenjavo alanina na 222. mestu proteinske sekvence z valinom, kar se odraža v zmanjšani encimski aktivnosti. Aktivnost encima je pri homozigotih TT zmanjšana za 70 %, pri heterozigotih pa za 35 % glede na encimsko aktivnost nemutiranega gena (11, 18).

1.3.1.2 Polimorfizem *MTHFR* c.1298A>C

Polimorfizem gena *MTHFR* c.1298A>C (rs1801131, Glu429Ala) je drugi najpogostejši polimorfizem gena *MTHFR*. Zamenjava adenina s citozinom na nukleotidnem mestu 1298 povzroči na proteinski ravni zamenjavo glutamata z alaninom na mestu 429. Sprememba se pojavi v delu gena, ki kodira regulacijsko domeno MTHFR encima. Aktivnost encima je pri homozigotih CC zmanjšana za 40 %, pri heterozigotih pa za 20 % glede na encimsko aktivnost nemutiranega gena (11, 18). Polimorfizma *MTHFR* c.677C>T in c.1298A>C sta v vezavnem neravnovesju in se skoraj nikoli ne dedujeta skupaj (11).

1.3.2 POLIMORFIZMI V *MTRR* GENU

Gen za *MTRR* se nahaja na krajši ročici kromosoma 5, na mestu 5p15.31. Encim, ki ga kodira gen *MTRR*, ima pomembno vlogo v metabolizmu homocisteina in spada v družino elektron transferaz. Encim ima tri vezavna mesta za vezavo flavin mononukleotida (FMN), flavin adenin dinukleotida (FAD) in nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Najpogostejši polimorfizem gena *MTRR* je *MTRR* c.66A>G (rs1801394, Met22Ile, AF(G) = 52 %). Na 66 nukleotidnem mestu zamenjava adenina z gvaninom povzroči na proteinski ravni na 22. mestu substitucijo izolevcina z metioninom. *MTRR* c.66A>G polimorfizem je prisoten v FMN vezavni domeni *MTRR* encima, vendar substitucija ne vpliva na katalitično aktivnost encima. Povezana pa je s povišano koncentracijo homocisteina v plazmi (10, 19, 20).

1.3.3 POLIMORFIZMI V *MTHFD1* GENU

Gen za *MTHFD1* se nahaja na daljši ročici kromosoma 14, na mestu 14q23.3. *MTHFD1* gen sestavlja 28 eksonov in meri 71 kb. *MTHFD1* je encim, ki ima v poti metabolizma folata tri funkcije (metilentetrahidrofolat dehidrogenaza, metilentetrahidrofolat ciklohidrolaza,

formiltetrahidrofolat sintetaza) v cirkulaciji homocisteina. Encim sestavljata dve domeni: sintezna in DC domena. Prva katalizira sintezo 10-formil-tetrahidrofolata iz THF in formata. *MTHFD1* c.1958G>A (rs2236225, Arg653Glu, AF(A) = 43 %) je polimorfizem gena *MTHFD1*, ki je v literaturi povezan s pojavom OFC. Mutacija je prisotna v 20. eksonu gena. Na 1958 nukleotidnem mestu pride do zamenjave adenina z gvaninom, kar na proteinski ravni povzroči zamenjavo arginina v glutamin na mestu 653. Polimorfizem dokazano povzroči destabilizacijo proteina in s tem zmanjša encimsko aktivnost encima MTHFD1 (21, 22, 23).

1.3.4 POLIMORFIZMI V *BHMT* GENU

Gen za BHMT se nahaja na daljši ročici 5. kromosoma na mestu 5q14.1. Sestavlja ga 8 eksonov in 7 intronov. Gen *BHMT* kodira citosolni metaloencim, ki katalizira pretvorbo betaina in homocisteina do dimetilglicina in metionina. Encim se primarno nahaja v jetrih in ledvicah ter za delovanje potrebuje cink. Odgovoren je za 50 % metilacije homocisteina v jetrih. *BHMT* c.742G>A (rs3733890, Arg239Gln, AF(A) = 32 %) je pogosta točkovna mutacija na 742. nukleotidnem mestu gena, ki se na proteinski ravni odrazi z zamenjavo arginina z glutaminom na mestu 239. Moteno delovanje encima privede do kopičenja homocisteina, ki lahko omejuje metilacijske reakcije in deluje teratogeno (24, 25).

1.3.5 POLIMORFIZMI V *GNMT* GENU

Glicin-N-metiltransferaza (GNMT) je multifunkcionalni tetramerni protein, ki ga kodira gen, lociran na 6. kromosomu, na mestu 6p12. GNMT protein deluje kot metiltransferazni encim in kot vezavni protein za folat. GNMT katalizira prenos metilne skupine iz S-adenozil-metionina (SAM) do S-adenozil-homocisteina (SAH), in sicer od vseh metiltransferaz pretvori največ SAM v SAH. Ekspresija *GNMT* gena je pomembna za celično obrambo pred stresom. V promotorski regiji gena *GNMT* so 3 polimorfna področja, ki vplivajo na aktivnost transkripcije. *GNMT* c.-45C>T (rs10948059, AF(T) = 49 %) je polimorfizem v promotorju gena, ki vodi do povišanih koncentracij homocisteina in je v literaturi povezan s pojavom rakavih obolenj (rak na prostati) (26). Alel T poveča transkripcijo gena in posledično tudi aktivnost GNMT (27).

1.3.6 POLIMORFIZMI V *DNMT3B* GENU

DNMT3B gen se nahaja na daljši ročici 20. kromosoma na mestu 20q11.2, sestavljen je iz 23 eksonov in 22 intronov. *DNMT3B* gen kodira DNA(citozin-5-)-metiltransferazo-3 β , encim, odgovoren za *de novo* metilacijo DNA molekule, še posebej med embriogenezo.

Protein številne študije povezujejo z imunsko pomanjklivostjo, nestabilnostjo centromer in obraznimi anomalijami. *DNMT3B* c.343-49C>T (rs2424913, AF(T) = 41 %) polimorfizem v intronu gena verjetno vpliva na njegovo izražanje. Za ta polimorfizem ni funkcijskih študij, je pa povezan z NTD, različnimi vrstami raka in nevrodegenerativnimi boleznimi (28, 29).

1.3.7 POLIMORFIZMI V *FPGS* GENU

Gen za *FPGS* (11,4 kb) se nahaja na daljši ročici kromosoma 9, na mestu 9q34.11. Sestavljen je iz 17 eksonov. V genu je bilo do sedaj odkritih več kot 40 polimorfizmov. Gen kodira folilpoliglutamat sintetazo, encim, pomemben za vzdrževanje homeostaze folata in proliferacijo celic (30, 31). Polimorfizem *FPGS* c.217-3839C>T (rs1544105, AF(T) = 40 %) se nahaja v intronu *FPGS* gena, kar lahko vpliva na ekspresijo gena. Nosilci CC genotipa imajo do 1,5-krat večjo količino mRNA prepisov *FPGS* gena v primerjavi z nosilci CT in TT genotipov (32). T alel je bil povezan z nižjimi vrednostmi mRNA in posledično zmanjšano ekspresijo *FPGS*. *FPGS* kot katalitični encim sodeluje pri presnovi metotreksata (MTX), ki se uporablja za zdravljenje akutne limfoblastne levkemije (ALL). Liu in sodelavci so dokazali, da je genotip CC pri ALL bolnikih povezan s slabšim preživetjem (32). Medtem ko je Huang s sodelovci dokazal, da genotip TT poveča možnost rezistence ALL bolnikov na MTX terapijo zaradi nižjih vrednosti mRNA prepisov *FPGS* gena (33).

1.3.8 POLIMORFIZMI V *DHFR* GENU

Gen za *DHFR* (30 kb) se nahaja na 5. kromosomu in je sestavljen iz šestih intronov in petih eksonov. Gen kodira dihidrofolat reduktazo (*DHFR*), ki pretvori dihidrofolat (DHF) do tetrahidrofolata (THF). Odkritih je bilo veliko polimorfizmov v *DHFR* genu, vendar njihov morebitni vpliv na izražanje in delovanje encima še ni znan. Najbolj preučevan polimorfizem *DHFR* gena je insercija/delecija 19 bp (rs70991108) v intronu 1, ki vpliva na ekspresijo proteina. Homozigoti za delecijo 19 bp v *DHFR* genu imajo znižane vrednosti mRNA prepisa. Polimorfizem *DHFR* c.253-2490C>A (rs1677693, AF(A) = 25 %) se nahaja v tretjem intronu *DHFR* gena (34, 35). Povezujemo ga s povečanim tveganjem za nastanek OFC (36), NTD (37) in CHD (38).

1.3.9 POLIMORFIZEM V *SLC19A1* GENU

Gen za folatni prenašalec *SLC19A1* se nahaja na daljši ročici kromosoma 21 na mestu 21q22.3. V literaturi je znan tudi kot: CHMD, FOLT, IFC1, REFC, RFC1, PCFT1. Sestavljen je iz 17 eksonov in je pri ljudeh zelo polimorfen. V povezavi z genom *SLC19A1* se v raziskavah najpogosteje pojavljajo polimorfizmi: rs1051266, rs1131596, rs12659,

rs1051296 in rs1051298. SLC19A1 ima vlogo prenašalca reduciranega folata in je vpleten v regulacijo znotraj celične koncentracije folata (39, 40, 41). Polimorfizem *SLC19A1* c.80G>A (rs1051266, Arg27His, AF(A) = 55 %) je najbolj obširno preučevana različica gena. Pogosti polimorfizem v drugem eksonu s točkovno mutacijo v kodirajoči regiji na mestu 80 povzroči zamenjavo gvanina z adeninom. Posledično se arginin zamenja s histidinom v kodonu transmembranske domene 1 (41).

1.4 OROFACIALNE SHIZE

Orofacialne shize (ang. *orofacial clefts*, OFC) zgornje ustnice in neba so pogoste prirojene razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline z zapleteno genetsko in okoljsko etiologijo. Razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline so bolj poznane pod imenom »volčje žrelo« ali »zajčja ustnica«. Z omenjeno okvaro se v Sloveniji vsako leto rodi od 30 do 40 otrok. Pojavnost v Sloveniji, 1/600 živorojenih otrok, je nekoliko višja od evropskega povprečja, ki znaša 1,5/1000 živorojenih otrok (42, 43, 44). Anomalije obraza in ustne votline predstavljajo estetski in funkcionalen problem. Zdravljenje poteka stopenjsko in zahteva obravnavo pri številnih specialistih. Rojstvo otroka z orofacialno shizo lahko prinese staršem hude stiske. V Sloveniji operativno zdravimo shize na Kliničnem oddelku za maksilofacialno in oralno kirurgijo v Ljubljani (44).

1.4.1 RAZVOJ IN NASTANEK OFC

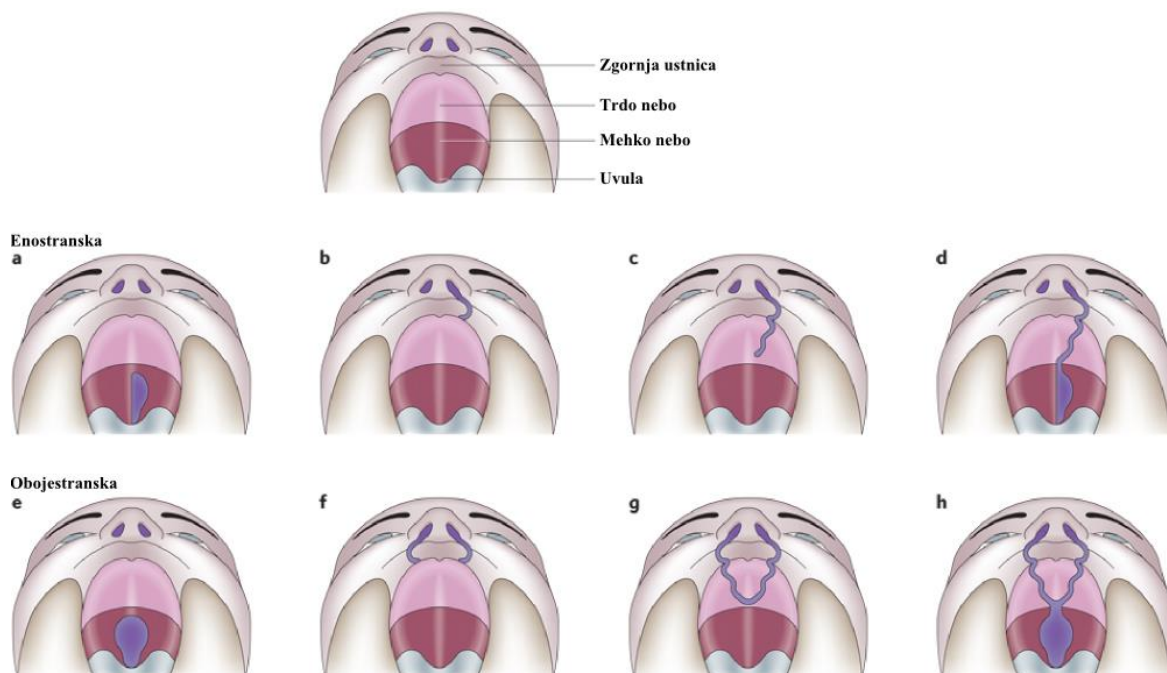
Pojav shize je povezan z nepopolnim zaraščanjem orofacialnih embrionalnih izboklin v prvem trimesečju, med 6. in 12. tednom nosečnosti, ki oblikujejo obraz in nekoliko kasneje ustno votlino. Shize primarnega neba so posledica nepopolnega zraščanja maksilarnih in srednjih nosnih izboklin. Zraščanje nastopi 40–48 dan po oploditvi in se v normalnem embrionalnem razvoju oblikuje v primarno nebo in zgornjo ustnico. Blažja oblika shize primarnega neba je omejena na zgornjo ustnico, medtem ko prizadetost dela nosne votline štejemo med zapletenejše. Pri shizah sekundarnega neba je moteno zraščanje nebni izboklin in nosnega pretina. V 6. tednu po oploditvi se oblikuje sekundarna plošča iz treh embrionalnih odrastkov, dveh sekundarnih palatalnih in primarnega odrastka. Odrastki pričnejo rasti eden proti drugemu v 8. tednu po oploditvi, združevanje nastopi v 9. tednu in se konča do 12. tedna po oploditvi. Zamude v razvoju sekundarnega neba vodijo do neustrezne fuzije odrastkov in nastanka OFC. Prav tako tudi pomanjkanje mezenhimske rasti in neustrezna transformacija epitelijskega tkiva. Spremenjena obrazna anatomija, vidna ob rojstvu, odraža plodovo funkcionalno prilagoditev na shizo (44, 45).

1.4.2 DELITEV IN KLASIFIKACIJA OFC

Orofacialne shize delimo na heilognatopalatoshize, če so v ustnici, čeljustnem grebenu in nebu, oziroma palatoshize, ki so omejene samo na nebo. V uporabi je delitev na tri podtipe: shize primarnega neba (heiloshiza, ang. *cleft lip*, CL), shize primarnega in sekundarnega neba (heilognatopalatoshiza, ang. *cleft lip and plate*, CLP) ter shize sekundarnega neba (palatoshiza, ang. *cleft plate*, CP) (Slika 3). Prekinitev primarnega neba (CL) se prične v lateralnem delu zgornje ustnice, malo stran od sredine, in je lahko delna ali seže skozi vso višino ustnice v nosni vhod. Prekinjen je lahko tudi čeljustni greben. CP je razcep mehkega in trdega neba do incizivnega foramna zaradi neustreznega združevanja lateralnih plošč. CLP označuje hkratni razcep primarnega in sekundarnega neba in predstavlja kombinacijo med CL in CP (16, 46, 47). Razcepe delimo iz vidika lokalizacije (ena ali obe strani ust oziroma ustne votline) na unilateralne ali enostranske (na levi ali desni strani) ter bilateralne ali dvostranske (obojestranske). Glede na obseg prizadetosti razcepe opredelimo na delne in popolne (16, 47). CLP predstavljajo skoraj 2/3 vseh obraznih malformacij in do 80 % vseh razcepov, razcep je zaradi neznanih vzrokov pogostejši na levi strani (16). CL in CLP so pogostejši pri moških, pri ženskah pa je CP oblika pogostejša. Ob rojstvu otroka z OFC se z vsako naslednjo nosečnostjo poveča tveganje za razvoj obraznih malformacij ploda za 2–5 % (3, 48).

Mednarodno združenje za plastično in rekonstruktivno kirurgijo je sprejelo klasifikacijo shiz po Van der Meulenu, ki temelji na embriološkem razvoju. V uporabi je tudi klasifikacija po Tessiersu, ki temelji na anatomiji obraza in je široko uporabljana v kirurgiji (47, 49).

OFC se večinoma pojavljajo kot izolirane nepravilnosti, lahko pa se kažejo kot eden izmed kliničnih znakov različnih sindromov. Glede na to razcepe delimo na sindromske in nesindromske. Sindromski razcepi so lahko posledice: trisomije 13, trisomije 18, trisomije 4p, Pierre Robin sekvence, velokardiofacialnega sindroma (ang. *velocardiofacial syndrom*, VCFS), Van der Woude sindroma in mnogih drugih (47, 49, 50).



Slika 3 (prirejeno po 51): Shematski prikaz normalne anatomske strukture orofacialnega področja (zgoraj) in različni tipi enostranskih ali obojestranskih shiz primarnega neba (CL) ali/in sekundarnega neba (CP, CLP) (spodaj).

a) prikazuje enostranski in e) obojestranski razcep mehkega neba; b), c) in d) prikazujejo različne stopnje enostranskega razcepa primarnega in sekundarnega neba; f), g) in h) prikazujejo različne stopnje obojestranskega razcepa primarnega in sekundarnega neba. Razcepi so na sliki vijolično obarvani.

1.4.3 FUNKCIONALNE POSLEDICE OFC

Prirojene razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline imajo poleg estetske malformacije, ki je v večini primerov zaradi spremenjene anatomije vidna že ob rojstvu, tudi številčne funkcionalne motnje. Med te sodijo: motnje hranjenja in požiranja, nosna regurgitacija, motnje dihanja, sluha, govora in mimike obraza (52). Novorojenci z nekaterimi oblikami shiz, kot sta CP in CLP, ne morejo sesati mleka, saj zaradi razcepa neba v ustni votlini ne uspejo ustvariti ustreznega podtlaka. Dihanje je lahko oteženo zaradi ukrivljenosti nosnega pretina, ki je pogost zaplet pri CLP (53). Otrok diha skozi usta, kar vpliva na nenormalen razvoj čeljusti in posledično tudi ugriza (malokluzija). Prisotno je moteno izražanje zob, nepravilnih oblik in velikosti, odsotnost zob narašča s stopnjo shize in poškodbo čeljustnega grebena. Disfunkcija srednjega ušesa zaradi oteženega odpiranja Evstahijeve cevi in zmanjšane prehodnosti zraka povzroča ponavljajoča, izlivna in akutna vnetja srednjega ušesa. Kronična vnetja in nastanek brazgotin v srednjem ušesu so povezana z nastankom prevodne naglušnosti (54). Prevodna naglušnost v kombinaciji s spremembo ugriza vodi do nastanka artikulacijskih motenj (težav v izgovorjavi glasov). Prisotne težave z ušesi in težave

v izgovorjavi glasov znatno vplivajo na razvoj govora pri otroku in na njegovo komunikacijo z okolico. Razvoj je v večini primerov zakasnel, popravi se po rekonstrukciji shize in zahteva strokovno pomoč (54, 55).

1.5 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK OFC

Nesindromske OFC malformacije imajo zapleteno in do sedaj precej nepojasnjeno etiologijo. OFC so multifaktorjalne bolezni, v nastanek so vpleteni tako genetski, demografski kot tudi okoljski dejavniki. Na razvoj embrija vplivata njegov dedni zapis in intrauterino okolje. Nanj pa prav tako vpliva materin dedni zapis preko genetskih in rastnih dejavnikov v povezavi z okoljskimi dejavniki (56).

1.5.1 DEMOGRAFSKI DEJAVNIKI

S pojavnostjo OFC povezujemo naslednje demografske dejavnike: **rasa**, **materina starost** in **socialno-ekonomski status (SES)**. Med rasami je vidna bistvena razlika v pojavnosti OFC. Največje tveganje za pojavitev prirojene razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline je prisotno med azijsko populacijo (1/500), sledi kavkazijska populacija (1/1000) in z najmanjšim tveganjem afriška populacija (1/2500) (57). Številne študije povezujejo pojavnost prirojenih napak z nižjim socialno-ekonomskim statusom. Slabša izobrazbena struktura (osnovnošolska izobrazba, nedokončana srednja šola), ki posledično rezultira v slabše plačanem delovnem mestu, je signifikantno povezana z nastankom OFC (58). Materina starost je znan dejavnik tveganja za razvoj kongenitalnih anomalij ploda. Številne študije so preiskovale vpliv starosti staršev na pojavnost OFC. V določenih študijah je bila pojavnost OFC pogostejša pri starejših materah (59, 60, 61), mlajših materah (61, 62) oziroma študije niso dokazale nobene povezave med starostjo staršev in pojavnostjo OFC (63). Prav tako so v študijah prišli do zaključkov, da imajo matere, mlajše od 25 let in starejše od 40 let, značilno višje tveganje za nastanek OFC (61).

1.5.2 OKOLJSKI DEJAVNIKI

Številne raziskave **kajenje in uživanje alkohola** med nosečnostjo opredeljujejo kot dejavnik tveganja (64, 65, 66). Ogljikov monoksid in nikotin, ki se sproščata med kajenjem, znižujeta raven kisika in povzročita tkivno hipoksijo in negativno vplivata na razvoj ploda še posebej v prvem trimesečju (65, 66). Sladkorne bolnice imajo večje tveganje za rojstvo otroka z OFC kot zdrave ženske. V obdobju nosečnosti lahko **sladkorna bolezen** ovira razvoj ploda in povzroči diabetično embriopatijo (56, 67). **Uživanje določenih zdravil in**

psihotropnih snovi v nosečnosti strokovnjaki povezujejo z etiologijo prirojenih nepravilnosti. Odsvetovano je uživanje protiepileptičnih zdravil, predvsem v prvem trimesečju, ker so umeščeni v skupino potencialnih teratogenov (65, 68, 69, 70). V času nosečnosti so po pogostosti takoj za prenatalnimi vitamini predpisani antibiotiki. Opažena je bila povezava med jemanjem amoksicilina v prvem trimesečju in povečanim tveganjem za OFC (71). V etiologijo OFC sodijo tudi **prehranski vplivi in dodatki**. Uživanje folatov in pripravkov folne kisline v kombinaciji z različnimi vitamini in minerali zmanjšuje tveganje za nastanek OFC (62, 63, 72). Med teratogene dejavnike spada tudi **povišana telesna temperatura** med nosečnostjo. Številne študije so izpostavile povišano telesno temperaturo v povezavi z večjim tveganjem za OFC (73, 74).

1.5.3 GENETSKI DEJAVNIKI

Geni imajo zelo pomembno vlogo pri razvoju normalne kraniofacialne strukture. Vpleteni so v nastanek sindromskih in nesindromskih OFC. Genetsko ozadje sindromskih OFC je v primerjavi z nesindromskimi OFC dokaj dobro poznano. Številni geni so vpleteni v etiologijo nesindromskih OFC glede na biološke procese, ki jih nadzorujejo. Gene lahko razvrstimo v šest skupin: a) anatomske razvoj, b) celična rast, celična delitev in celična smrt, d) celični transport, e) celična organizacija struktur, f) organ/sistem specifični procesi. Na podlagi izsledkov različnih raziskav je sedaj poznanih 26 kandidatnih genov na 6 genomskih lokusih, vpletenih v nastanek OFC: *MSX1*, *PAX9*, *IRF6*, *TP63*, *KMT2D*, *KDM6A*, *SATB2*, *TBX22*, *TGF α* , *TGF β 3*, *TGF β 2*, *FGF8*, *FGFR1*, *WNT3*, *WNT5A*, *CDH1*, *CHD7*, *AXIN2*, *KDM6A*, *KISS1R*, *TWIST1*, *BCOR*, *OFD1*, *PTCH1*, *PITX2* in *PVRL1*. Določeni geni so hkrati vpleteni v nastanek sindromskih kot tudi nesindromskih OFC (16). Povezovanje pomanjkanja folatov v nosečnosti s pojavnostjo prirojenih motenj je usmerilo raziskave v preučevanje polimorfizmov v genih, ki sodelujejo v ciklu presnove folatov. Med njimi je najbolj preučevan gen *MTHFR* in njemu pripadajoča polimorfizma c.677C>T in c.1298A>C (17).

2. NAMEN

Namen naloge je ugotoviti, ali so prisotne razlike v odzivu na folno kislino in 5-metiltetrahidrofolat med različnimi genotipi polimorfizmov genov folatnega cikla, kar bi lahko imelo pomen pri preprečevanju prirojenih motenj, med njimi tudi OFC. Uporabili bomo dva modela: celične linije in pare otrok s shizo in njihovih zdravih sorojencev.

Namen našega dela bo:

1. Ugotoviti razlike v odzivu na folno kislino in 5-metiltetrahidrofolat glede na spremembe izbranih desetih polimorfizmov genov folatnega cikla: *MTHFR* (rs1801133), *MTHFR* (rs1801131), *MTRR* (rs1801392), *MTHFD1* (rs2236225), *BHMT* (rs3733890), *GNMT* (rs10948059), *DNMT3B* (rs2424913), *FPGS* (rs1544105), *DHFR* (rs1677693) in *SLC19A1* (rs1051266). Zanima nas vpliv omenjenih polimorfizmov na metabolno aktivnost celic limfoblastoidne celične linije (LCL). Metabolno aktivnost celic bomo primerjali med šestimi celičnimi linijami z različno kombinacijo polimorfizmov v ključnih genih folatnega cikla, ki so v mediju brez folne kisline gojene vsaj en teden. LCL bomo tretirali s petimi različnimi koncentracijami folne kisline ali 5-metiltetrahidrofolata. Podatke, pridobljene s testom metabolne aktivnosti LCL, bomo analizirali z uporabo ustreznih statističnih pristopov.
2. Ugotoviti vpliv posameznih polimorfizmov v genih, ki sodelujejo pri presnovi folatov, na pojavnost OFC. Osredotočeni bomo na preučevanje vpliva desetih polimorfizmov v devetih genih: *MTHFR* (rs1801133), *MTHFR* (rs1801131), *MTRR* (rs1801392), *MTHFD1* (rs2236225), *BHMT* (rs3733890), *GNMT* (rs10948059), *DNMT3B* (rs2424913), *FPGS* (rs1544105), *DHFR* (rs1677693) in *SLC19A1* (rs1051266). Upoštevali bomo tudi vpliv izbranih demografskih in okoljskih dejavnikov tveganja za razvoj OFC: starost matere ob zanositvi, leto rojstva otroka, telesna teža matere ob zanositvi, prednosečniški diabetes, nosečniški (gestacijski) diabetes, druga kronična obolenja matere, povišana telesna temperatura v prvem trimesečju nosečnosti, uživanje drugih zdravil med nosečnostjo, jemanje pripravkov s folno kislino in drugih prehranskih dopolnil ter vnos folatov in metionina s hrano v prvem trimesečju nosečnosti. Vse našteje genetske in okoljske dejavnike tveganja bomo primerjali med otroki z OFC in njihovimi zdravimi sorojenci. Prednost uporabe takega modela je v tem, da s tako primerjavo zmanjšamo vpliv okoljskih

dejavnikov, ki bi lahko zameglili vpliv genetskih dejavnikov tveganja. Iz brisov bukalne sluznice otrok z OFC in njihovih zdravih sorojencev bomo izolirali DNA in za izbrane polimorfizme določili genotipe z uporabo TaqMan[®] tehnologije. Podatke, pridobljene z genotipizacijo in anketnim vprašalnikom, ki ga bodo izpolnile matere otrok, bomo analizirali z uporabo ustreznih statističnih pristopov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI IN POTEK ŠTUDIJE

Študija je del raziskave z naslovom Analiza bioloških označevalcev presnove folatov za ugotavljanje ogroženosti s prirojenimi razvojnimi napakami, ki poteka v okviru programa Metabolni in prirojeni dejavniki reproduktivnega zdravja, porod II (P3-0124) in projekta (J3-5507). Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 57/02/13) in v njej sodelujejo Univerzitetni klinični center Ljubljana (Ginekološka klinika, Pediatrična klinika in Klinični oddelek za maksilofacialno in oralno kirurgijo) ter Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani. V sklopu omenjenega projekta so predhodno že primerjali genetske in okoljske dejavnike tveganja med otroki z OFC in kontrolno skupino zdravih otrok ter materami otrok z OFC in kontrolno skupino mater.

V nadaljevanju smo v študijo vključili še 122 zdravih sorojencev otrok z OFC z namenom določitve genetskih in okoljskih dejavnikov tveganja za nastanek OFC. Izmed 122 zdravih sorojencev smo brise bukalne sluznice za izolacijo DNA pridobili samo pri 44. Tako je bilo v analizo okoljskih dejavnikov tveganja za OFC vključenih 122 parov sorojencev, v analizo genetskih dejavnikov pa 44 parov. Biološki vzorec za genetske analize je bil bris bukalne sluznice. Matere parov sorojencev so izpolnile anketni vprašalnik, ki je vključeval vprašanja o izpostavitvi okoljskim dejavnikom tveganja (Priloga 1).

Vzorci so bili do obdelave shranjeni v hladilniku pri 4 °C. Iz dobljenih brisov smo z metodo izsoljevanja izolirali DNA. Izmerili smo koncentracijo izolirane DNA ter vzorce ustrezno redčili do koncentracije 4 ng/μL. Redčene vzorce smo do analize hranili v hladilniku pri 4 °C.

Genotipizacijo 10 polimorfizmov v 9 genih, vključenih v presnovo folatov, smo izvedli z uporabo TaqMan® in SimpleProbe® tehnologije. V okviru te magistrske naloge smo opravili genotipizacijo vzorcev DNA zdravih sorojencev in LCL (gojenih v mediju L0505). Podatki genotipizacije o preiskovanih polimorfizmih otrok z OFC so bili zbrani iz magistrskih nalog Jurke Klun, Tine Štruc in raziskovalne naloge Tine Kek.

Na izbranih LCL, gojenih v mediju brez folne kisline (L0503), smo po tretiranju z različnimi koncentracijami folne kisline ali 5-metiltetrahidrofolata izvedli test metabolne aktivnosti. Naredili smo tri biološke ponovitve s tremi tehničnimi ponovitvami.

3.2 TEST ZA DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS

MTS test spada med celično osredotočene metode za vrednotenje celične proliferacije in metabolne aktivnosti. MTS test je kolorimetrična metoda, ki temelji na redukciji tetrazolija do obarvanega formazanskega produkta. MTS je tetrazolijeva sol, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol. MTS reagent je zmes barvila MTS v obliki soli in akceptorja elektronov PES (fenazin etil sulfat). Metabolno aktivne celice so ob prisotnosti PES sposobne reducirati barvilo MTS do formazana. Encimska aktivnost dehidrogenaz omogoči nastanek reducirajočih molekul (NADH ali NADPH) in prenos elektronov na PES, ta pa redukcijo MTS do v mediju topnega obarvanega produkta. Produkt je vijolično-modro obarvan z absorpcijo pri 492 nm. Z merjenjem absorbance dobimo količino nastalega formazana, ki je sorazmerna deležu živih, metabolno aktivnih celic v celični kulturi. Test nam omogoča vpogled v preživetje celic in njihovo metabolno aktivnost po tretiranju s preiskovanimi spojinami (75).

Na podlagi porazdelitve polimorfizmov in zastopanosti kombinacije alelov ključnih genov folatnega cikla smo za MTS test izbrali 6 različnih LCL, gojenih v mediju brez folne kisline (L0503) vsaj en teden. LCL smo predhodno genotipizirali (Preglednica I).

Preglednica I: Genetski profili folatnega cikla izbranih šestih limfoblastoidnih celičnih linij (LCL). Mutirani aleli so prikazani z modro barvo.

LCL oznaka	MTHFR 677	MTHFR 1298	MTRR	MTHFD1	BHMT	GNMT	DNMT3B	FPGS	DHFR	SLC19A1
1516	TT	AA	GG	AA	GG	CC	CT	TT	CA	GG
1823	CT	AC	AG	GA	GA	CC	CC	CT	CC	GG
6037	CT	AA	AG	AA	GG	TT	TT	CC	CC	GA
380	CC	AA	AG	AA	GG	CT	TT	CC	CC	AA
388	CC	CC	AG	GA	GA	CT	TT	CT	CA	GA
5876	CT	AC	AA	AA	GG	CT	TT	CT	CC	GG

3.2.1 Materiali in oprema

Za MTS test – testiranje LCL s folno kislino in 5-metiltetrahidrofolatom smo uporabili:

- folno kislino (FA; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM, Sigma),

- 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM, Sigma),
- medij za gojenje celic brez folne kisline (L0503, BioWest),
- MTS reagent (CellTiter 96, A Queous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, ZDA),
- 12-vdolbinčasto in 96-vdolbinčasto mikrotitrsko ploščo za pipetiranje (TPP[®], Tissue Culture Plate),
- pipete in ustrezne avtoklavirane nastavke za pipetiranje (10 µL, 200 µL, 1000 µL),
- multikanalno pipeto in ustrezne avtoklavirane nastavke za pipetiranje (10-100 µL),
- vibracijski mešalnik (Bio Vortex V1, Biosan),
- CO₂ inkubator (37 °C; Panasonic MC-18 AIC),
- čitalec mikrotitrskih plošč (Biotek).

3.2.2 MTS TEST – TESTIRANJE LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ S FOLNO KISLINO IN 5-METILTETRAHIDROFOLATOM

Postopek

Za tretiranje LCL s folno kislino in 5-Me-THF smo pripravili suspenzijo izbrane celične linije s koncentracijo $0,33 \times 10^6$ celic/mL (v mediju brez folne kisline L0503), dobro premešali in na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami odpipetirali po 90 µL celične suspenzije v triplikatu. Nato smo pripravili različne koncentracije folne kisline in 5-Me-THF in jih po 10 µL odpipetirali na mikrotitrsko ploščico, tako da je bila končna koncentracija spojin v vdolbinicah 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM in 100 nM. Prenos smo izvedli z multikanalno pipeto in reverznim pipetiranjem, v času tretiranja pa smo imeli v laminariju ugasnjeno luč zaradi občutljivosti folatnih spojin na svetlobo. Tako pripravljene mikrotitrške plošče smo inkubirali v inkubatorju za gojenje celic (37 °C, 5 % CO₂, 100 % vlažnost) za 24 oziroma 72 ur. Po 21- oziroma 69-urni inkubaciji smo v vsako vdolbinico dodali 10 µL reagenta MTS. Sledila je 2- do 4-urna inkubacija in meritev absorbance nastalega formazana pri 492 nm z mikrotitrskim čitalcem.

3.3 IZOLACIJA DNA

Za izolacijo DNA iz LCL in brisov ustne sluznice smo uporabili komplet reagentov »MasterPure[™] Complete DNA and RNA Purification Kit« (76). Postopek izolacije DNA iz LCL in brisov ustne sluznice se je razlikoval v začetnih korakih priprave vzorca za izolacijo

DNA. Vzorci brisov ustne sluznice so bili do obdelave shranjeni v hladilniku pri 4 °C. Za potrebe izolacije DNA iz brisov ustne sluznice smo uporabili dva od treh odvzetih preiskovančevih brisov. Za izolacijo DNA iz LCL smo uporabili suspenzijo izbrane celične linije v koncentraciji 1×10^6 celic/mL. Izolacijo DNA smo izvedli po navodilih proizvajalca.

3.3.1 Izolacija DNA iz limfoblastoidnih celičnih linij

3.3.1.1 Materiali in oprema

Za potrebe izolacije DNA iz LCL smo uporabili:

- komplet reagentov »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina company):
 - Tissue and Cell Lysis Solution,
 - MPC Protein Precipitation Reagent,
 - Proteinase K,
 - TE Buffer;
- PBS pufer (1X),
- 70 % etanol (EtOH),
- 96–100 % izopropanol,
- 1,5 mL avtoklavirane Eppendorfove epruvete,
- pipete in ustrezne avtoklavirane nastavke za pipetiranje (10 µL, 200 µL, 1000 µL),
- podstavek za epruvete,
- podstavek za falkonke,
- falkonke (10 mL, 50 mL),
- vibracijski mešalnik (Bio Vortex V1, Biosan),
- centrifugo (Thermo Scientific Megafuge 16R Centrifuge, Eppendorf Centrifuge 5430R),
- minicentrifugo (Mini Centrifuge MCF-2360, LMS),
- vodno kopel (WB-4MS, Biosan),
- tripansko modrilo,
- Neubauerjevo komoro,
- invertni mikroskop (Olympus CK40),
- LAF komoro (komora z laminarnim pretokom zraka, Iskra Pio).

3.3.2 Izolacija DNA iz brisov ustne sluznice

3.3.2.1 Materiali in oprema

Za potrebe izolacije DNA iz brisov bukalne sluznice smo uporabili:

- komplet reagentov »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina company):
 - Tissue and Cell Lysis Solution,
 - MPC Protein Precipitation Reagent,
 - Proteinase K,
 - TE Buffer;
- PBS pufer (1X),
- 70 % etanol (EtOH),
- 96–100 % izopropanol,
- 1,5 mL avtoklavirane Eppendorfove epruvete,
- pipete in ustrezne avtoklavirane nastavke za pipetiranje (10 µL, 200 µL, 1000 µL),
- podstavek za falkonke in epruvete,
- falkonke (10 mL),
- vibracijski mešalnik (Bio Vortex V1, Biosan),
- centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5430R),
- minicentrifugo (Mini Centrifuge MCF-2360, LMS),
- vodno kopel (WB-4MS, Biosan),
- laboratorijske škarje in pinceto.

3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA

Koncentracijo izolirane DNA v vzorcih smo določili z NanoDrop® ND-1000 spektrofotometrom, z merilnim območjem med 220 in 750 nm (77). Na spodnje optično merilno mesto smo odpipetirali 1,5 µL vzorca. Zgornjo optično ročico, ki zagotavlja vir svetlobe, smo položili na spodnje optično mesto, pod katerim se nahaja CCD detektor. Aparat je oblikoval milimetrski stolpec vzorca ob stiku obeh optičnih enot, skozi katerega je potovala svetloba. CCD detektor je posnel intenziteto prepuščene svetlobe pri 260 nm. Pred meritvijo smo optično merilno mesto ustrezno očistili z destilirano vodo (dH₂O). Najprej smo opravili meritev slepega, pufru (TE Buffer) in nato preiskovanega vzorca. Na podlagi dobljenih koncentracij smo vzorce redčili z avtoklavirano destilirano vodo do končne

koncentracije 4 ng/ μ L. Količino izolirane DNA smo ocenili z meritvijo absorbance pri 260 nm. Z meritvijo razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm ocenimo čistost razopine DNA.

3.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižno reakcijo s polimerazo (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) je učinkovita *in vitro* metoda sinteze nukleinskih kislin, ki omogoča hitro pomnožitev specifičnega odseka DNA. PCR reakcija poteka ciklično v treh stopnjah: denaturacija DNA (94–95 °C), prileganje oligonukleotidnih začetnikov (40–60 °C) in podaljševanje oligonukleotidnih začetnikov s polimerazo DNA (70 °C). Omenjene stopnje predstavljajo en cikel, ki ga ponovimo 30- do 40-krat, v vsakem ciklu se tarčni odsek matrične DNA podvoji (78). Nadgradnja konvencionalnega PCR je PCR v realnem času, imenovan tudi kinetični PCR, ki omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Za določanje polimorfizmov v genih presnove folatov smo uporabili PCR v realnem času. Signal smo detektirali v končni točki s pomočjo hidrolizirajoče TaqMan® sonde.

Velikokrat imamo na voljo le manjšo količino preiskovanega odseka DNA za analizo. Zato pri večini metod genotipizacije odsek DNA predhodno pomnožimo s PCR metodo (79).

3.5.1 Materiali in oprema

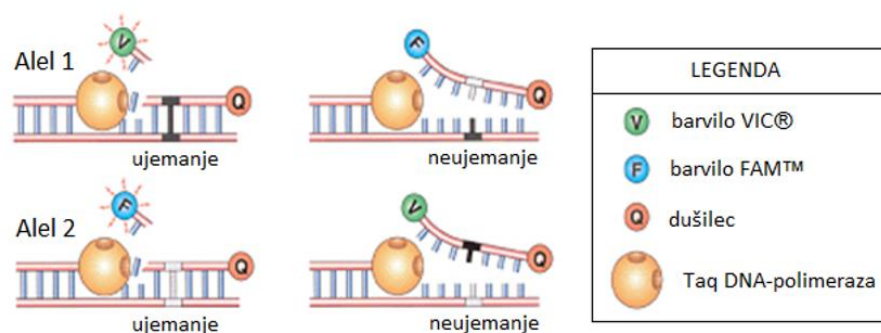
Uporabili smo:

- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_1202883_20 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_850486_20 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_306817_10 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_1376137_10 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_11646606_20 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_11425842_10 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_25620192_20 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_8342611_10 (Applied BioSystems),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_3103231_20 (Applied BioSystems),
- TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (2X) (Applied BioSystems),
- LightSNiP rs1051266 Genotyping Assay (TIB MOLBIOL),
- visoko prečiščeno in avtoklavirano vodo,
- LightCycler® 480 System (Roche),

- LightCycler® Multiwell plate 384 (Roche),
- LightCycler® Sealing Foil (Roche),
- delovno komoro z UV lučko (DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR, Biosan),
- vrtinčasto mešalo in minicentrifugo (Combi-Spin, Biosan),
- centrifugo (Mikro-242, Tehnica Železniki),
- 1,5 mL avtoklavirane Eppendorfove epruvete,
- pipete in ustrezne avtoklavirane nastavke za pipetiranje (10 µL, 200 µL, 1000 µL),
- podstavke za epruvete,
- mikrotitrsko ploščo.

3.5.2 Genotipizacija s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami

Pri genotipizaciji s hidrolizirajočimi sondami izkoriščamo 5′–3′ eksonukleazno aktivnost termostabilne Taq DNA-polimeraze. V reakcijsko zmes za PCR poleg vseh potrebnih komponent dodamo še dve fluorescentno označeni sondi (18–20 bp), ki specifično prepoznata in se vežeta na tarčno zaporedje DNA. Sonde se med seboj razlikujeta po specifičnem mestu vezave (ena se popolnoma prilega na nemutirano zaporedje, druga pa na mutirano zaporedje) in po poročevalskem barvilu, fluoroforu. Sonde imata na 5′ koncu vezano poročevalsko (ang. *reporter*) barvilo, na 3′ koncu pa dušilec (ang. *quencher*) (79, 80). TaqMan® ali 5′ nukleazna metoda temelji na fluorescenčnem resonančnem prenosu energije (ang. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET) in zaradi prisotnosti dušilca intaktni sonde ne fluorescirata. Po principu FRET se fluorescentna emisija ekscitiranega poročevalskega barvila zaradi bližine dušilca prestreže. Tekom PCR, 5′–3′ eksonukleazna aktivnost Taq DNA-polimeraze v fazi podaljševanja povzroči hidrolizo samo popolnoma prilegajoče sonde. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča, prestrežanje fluorescence je onemogočeno. Posledično fluorescenca reporterskega barvila poraste in je sorazmerna s količino PCR produkta. V primeru porasta fluorescence enega barvila je preiskovanec homozigot za označeno (nemutirano ali mutirano) zaporedje. Preiskovanec je heterozigot, če porasteta obe fluorescenci (80, 81). Za genotipizacijo s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami smo uporabili fluorescentni barvili VIC® in 6-karboksi-fluorescein (FAMTM) (Slika 4).



Slika 4 (prirejeno po 82): Princip genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami TaqMan®.

Postopek

V delovni komori smo za vsakega izmed devetih polimorfizmov v ločenih, ustrezno označenih 1,5 mL Eppendorfovih epruvetah pripravili reakcijsko mešanico brez vzorčne DNA. Reakcijske zmesi so se med seboj razlikovale v uporabljenih parih sond in oligonukleotidnih začetnikih. Pri testiranih polimorfizmih je bila ena sonda na 5' koncu označena z reporterskim barvilom VIC®, drugo sondo pa je označevalo reportersko barvilo FAM™ (Preglednica II).

Preglednica II: Uporabljeni testni kompleti TaqMan®.

Gen	Polimorfizem	Testni komplet	VIC®	FAM™
MTHFR 677	rs1801133	C_1202883_20	C = nemutirano zaporedje	T = mutirano zaporedje
MTHFR 1298	rs1801131	C_850486_20	C = mutirano zaporedje	A = nemutirano zaporedje
MTRR	rs1801394	C_306817_10	A = nemutirano zaporedje	G = mutirano zaporedje
MTHFD1	rs2236225	C_1376137_10	A = mutirano zaporedje	G = nemutirano zaporedje
BHMT	rs3733890	C_11646606_20	A = mutirano zaporedje	G = nemutirano zaporedje
GNMT	rs10948059	C_11425842_10	C = nemutirano zaporedje	T = mutirano zaporedje
DNMT3B	rs2424913	C_25620192_20	C = nemutirano zaporedje	T = mutirano zaporedje

Gen	Polimorfizem	Testni komplet	VIC®	FAM™
FPGS	rs1544105	C_8342611_10	C = nemutirano zaporedje	T = mutirano zaporedje
DHFR	rs1677693	C_3103231_20	C = nemutirano zaporedje	A = mutirano zaporedje

Sestavo PCR-reakcijske mešanice smo izračunali glede na število genotipiziranih vzorcev. Količino posameznih sestavin reakcijske mešanice smo pomnožili s številom vzorcev (pri tem smo upoštevali tudi slepe vzorce) in prišteli 10 % pribitek zaradi izgub pri pipetiranju. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo v delavni komori premešali na vrtinčastem mešalu in nato centrifugirali. Po 3,5 µL reakcijske mešanice smo napipetirali v mikroepipetvetke ploščice za genotipizacijo. Po načrtu pipetiranja smo v ustrezne mikroepipetvetke dodali še 1,5 µL vzorčne DNA s koncentracijo 4 ng/µL. Sestava PCR-reakcijske mešanice enega vzorca je navedena v Preglednici III.

Preglednica III: Sestava PCR – reakcijske mešanice enega vzorca.

Reakcijska mešanica	Volumen (µL)
TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (2X)	1,2
Mešanica ustreznih sond in oligonukleotidnih začetnikov TaqMan® (40X)	0,15
Ultra čista voda	3,15
Vzorčna DNA (4 ng/µL)	1,5
Skupni volumen reakcijske zmesi enega vzorca	6

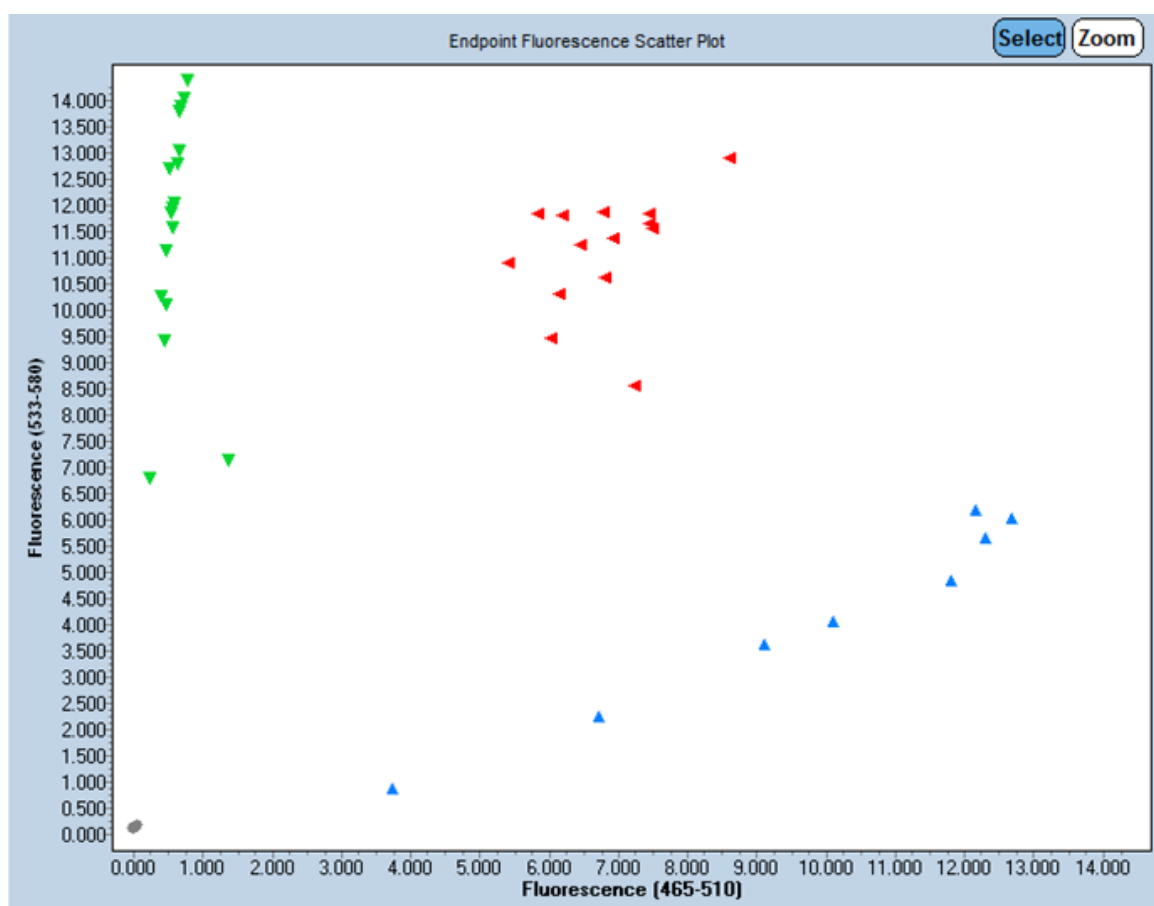
Na koncu smo ploščico prekrili s folijo in jo 2 minuti centrifugirali pri 2000 obratih/min, vstavili v aparat LightCycler® 480 System (Roche) in zagnali genotipizacijo po vnaprej določenem programu, navedenem v Preglednici IV.

Preglednica IV: Program izvedbe PCR s TaqMan® sondami.

Stopnja	Temperatura	Čas
UNG inkubacija	50 °C	2 min

Stopnja		Temperatura	Čas
Aktivacija polimeraze		95 °C	10 min
PCR (50 ciklov)	Denaturacija	95 °C	15 s
	Prileganje/podaljševanje	60 °C	1 min

Po končani PCR reakciji v realnem času aparat v končni točki na podlagi izmerjene fluorescence poda točkast graf alelna diskriminacije. Na grafu vsaka točka predstavlja en vzorec. Vzorci se med seboj ločijo na podlagi jakosti obeh tipov fluorescenc v tri skupine in tako predstavljajo tri različne genotipe (Slika 5).

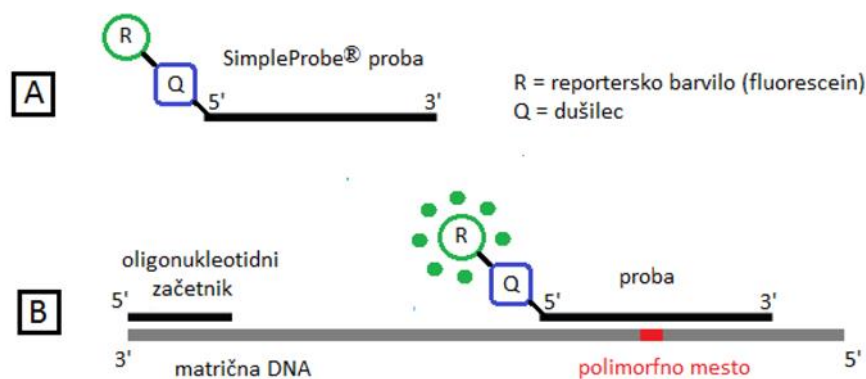


Slika 5: Grafični prikaz alelna diskriminacije za polimorfizem DHFR rs1677693. X-os predstavlja fluorescentno barvilo FAMTM, y-os pa barvilo VIC®. Z modro barvo so prikazani homozigoti za mutirano zaporedje (AA), z rdečo heterozigoti (AC), z zeleno homozigoti za nemutirano zaporedje (CC).

3.5.3 Genotipizacija z analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti ob uporabi SimpleProbe® tehnologije

Analiza talilna krivulja visoke ločljivosti (ang. *high resolution melting analysis*, HRM analiza) je zelo uporabna post-PCR metoda, ki je v uporabi od leta 2003. Ima široko uporabnost v molekularni biologiji za detekcijo mutacij, polimorfizmov in epigenetskih sprememb dvojne vijačnice DNA. Genotipizacija s HRM analizo temelji na razliki v temperaturni stabilnosti med duplekse s popolnim in nepopolnim prileganjem tarčne enoverižne DNA (sDNA).

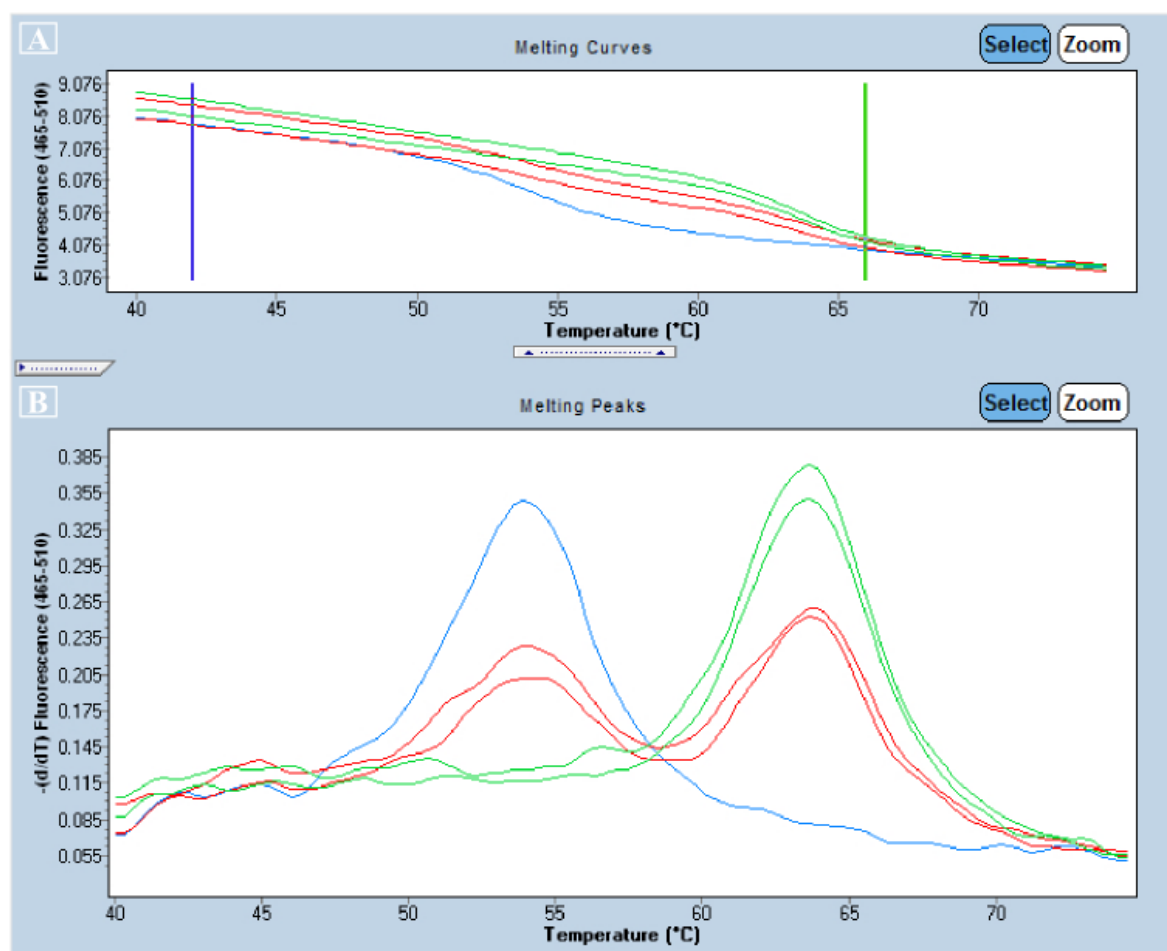
HRM analizo pričnemo s pomnožitvijo tarčnega odseka DNA okoli izbranega SNP-ja s PCR v realnem času. Za HRM analizo potrebujemo vzorčno DNA, reakcijsko mešanico z vsemi potrebnimi sestavinami za PCR in ustrezno fluorescentno barvilo. V ta namen smo uporabili SimpleProbe® probo, ki je na enem koncu označena z nefluorescenčnim dušilec in reporterskim fluoroforom. Kadar je proba nevezana, prosta v reakcijski mešanici, dušilec v večji meri prestreže fluorescenco ekscitiranega reporterskega barvila. Ko pride do prileganja probe in vezave na tarčni odsek DNA, se z vezavo probe zmanjša prestrežanje fluorescence s strani dušilca, kar se odrazi kot porast fluorescence reporterskega barvila (83) (Slika 6).



Slika 6 (prirejeno po 84): Shematski prikaz delovanja SimpleProbe® probe v primeru: A) SimpleProbe® proba v reakcijski mešanici prosta, B) SimpleProbe® proba, vezana na tarčno DNA.

Sama HRM analiza poteka v treh stopnjah v aparaturah visoke ločljivosti. V prvi stopnji z dvigom temperature na 95 °C povzročimo denaturacijo dvovertičnih ampliconov in oblikovanje enoverižnih. Sledi prileganje probe in v zadnji stopnji postopno dvigovanje temperature. Korak imenujemo talilna analiza, ker višamo temperaturo z namenom nastanka karakterističnih talilnih profilov (83). V stopnji prileganja se tvorijo duplesi med označeno probo in razklenjeno, enoverižno DNA. V zadnji stopnji dvig temperature povzroči

razklenitev nastalih dupleksov, kar se odraža v upadu fluorescence. Temperaturo, pri kateri se razkrene polovica dupleksov, imenujemo temperatura taljenja (ang. *melting temperature*, T_m) (85) (Slika 7).



Slika 7: A) Različne talilne krivulje pri različnih genotipih za SLC19A1 rs1051266. Modra krivulja prikazuje homozigote za nemutirano zaporedje (GG), zelena krivulja prikazuje homozigota za mutirano zaporedje (AA), heterozigota (AG) prikazuje rdeča krivulja. B) Različni talilni vrhovi pri različnih genotipih za SLC19A1 rs1051266. Moder talilni vrh ima T_m pri 53,92 °C in prikazuje homozigota GG; zeleni talilni vrh ima T_m pri 63,92 °C in prikazuje homozigota AA; rdeča talilna vrhova prikazujeta heterozigota GA.

Postopek

V delovni komori smo v ustrezno označeni 1,5 mL Eppendorfovi epruveti pripravili reakcijsko mešanico brez vzorčne DNA. Po navodilih proizvajalca smo najprej pripravili mešanico LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10X). To smo storili tako, da smo v vialo z DNA polimerazo prenesli 60 μ L vsebine vial s potrebno mešanico za PCR (reakcijski pufer, 10 mM $MgCl_2$ in deoksinukleozid trifosfati). Pripravljeni mešanici smo dodali oligonukleotidna začetnika, probo (LightSNiP rs1051266 Genotyping Assay),

ultračisto vodo in MgCl_2 (25 mM). Količino posameznih sestavin reakcijske mešanice smo pomnožili s številom vzorcev (pri tem smo upoštevali tudi kontrole) in prišteli 10 % pribitka zaradi izgub pri pipetiranju. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo premešali in na kratko centrifugirali. Po 7,5 μL reakcijske mešanice smo napipetirali v mikroepruvetke na ploščici za genotipizacijo. Po načrtu pipetiranja smo v ustrezne mikroepruvetke dodali še 2,5 μL vzorčne DNA s koncentracijo 4 ng/ μL . Sestava reakcijske mešanice enega vzorca je navedena v Preglednici V.

Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice enega vzorca za PCR in HRM analizo.

Sestava	Volumen (μL)
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10X)	1
LightSNiP rs1051266 Genotyping Assay	0,3
Ultra čista voda	5,4
MgCl_2 (25 mM)	0,8
Vzorčna DNA (4 ng/ μL)	2,5
Skupni volumen reakcijske zmesi enega vzorca	10

Ploščico smo prekrili s folijo in jo 2 minuti centrifugirali pri 2000 obratih/min in nato vstavili v aparat LightCycler® 480 System (Roche), ki je izvedel PCR v realnem času in HRM analizo po vnaprej določenem programu, navedenem v Preglednici VI. Po končani analizi aparat za vsak vzorec poda rezultate v obliki talilnih krivulj in vrhov.

Preglednica VI: Program izvedbe PCR in HRM analize.

STOPNJA		TEMPERATURA	ČAS
Preinkubacija		95 °C	10 min
PCR (45 ciklov)	Denaturacija	95 °C	10 s
	Prileganje začetkov	60 °C	10 s
	Podaljševanje	72 °C	15 s
HRM analiza	Denaturacija	95 °C	30 s
	Prileganje probe	40 °C	2 min
	Taljenje	40 °C → 75 °C	+ 0,19 °C/s
Hlajenje		40 °C	30 s

3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo podatkov, ki smo jih pridobili z anketnim vprašalnikom, genotipizacijo in MTS testom, smo uporabili program SPSS, verzija 22 (SPSS Inc., Chicago, ZDA). Vsi testi so bili dvostranski. Kot mejo statistične značilnosti smo uporabili $\alpha = 0,05$.

3.6.1 REZULTATI MTS TESTA

Za preučevanje vpliva neodvisnih spremenljivk (genotip, vrsta spojine in koncentracija spojine) na odvisno spremenljivko (metabolna aktivnost celic) ter ugotavljanje morebitne interakcije med neodvisnimi spremenljivkami smo uporabili dvosmerno ANOVA-o (»two-way ANOVA«).

3.6.2 ANKETNI VPRAŠALNIK

Podatke, pridobljene z anketnim vprašalnikom, smo zaradi enostavnejše obdelave najprej razdelili na numerične in kategorične. Z uporabo deskriptivne statistike smo izračunali srednje vrednosti numeričnih spremenljivk in nato preverili normalnost porazdelitve spremenljivk s Shapiro-Wilkovim testom. Na podlagi rezultatov testov normalnosti porazdelitve smo izbrali ustrezne statistične teste. Za normalno porazdeljene numerične spremenljivke smo uporabili odvisni t-test, za nenormalno porazdeljene numerične spremenljivke pa neparametrični Wilcoxon test za odvisne vzorce. Kategoričnim spremenljivkam smo v prvi stopnji določili frekvence izidov v posamezni kategoriji. Za statistično analizo dihotomnih spremenljivk (razvrščenih v dve kategoriji) smo uporabili neparametrični McNemarjev test. Z neparametričnim marginalnim testom homogenosti smo analizirali spremenljivke, razvrščene v več kot dve kategoriji. Določene spremenljivke, ki so ob uporabi statističnih testov pokazale statistično značilne razlike ($p < 0,05$), smo predstavili tudi grafično.

3.6.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE

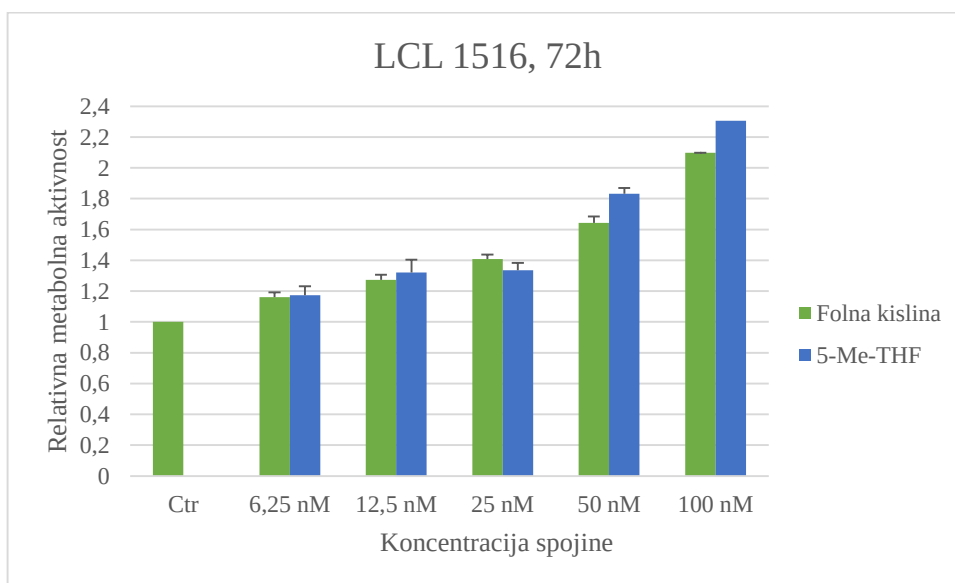
Želeli smo ugotoviti, ali so prisotne statistično pomembne razlike med otroki z OFC in zdravimi sorojenci v frekvenci posameznih genotipov. Za lažjo analizo smo rezultate genotipizacije kodirali kot aditivni, recisivni in dominantni genetski model. Aditivni model smo statistično analizirali z neparametričnim marginalnim testom homogenosti, za recisivni in dominantni model smo uporabili neparametrični McNemarjev test.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

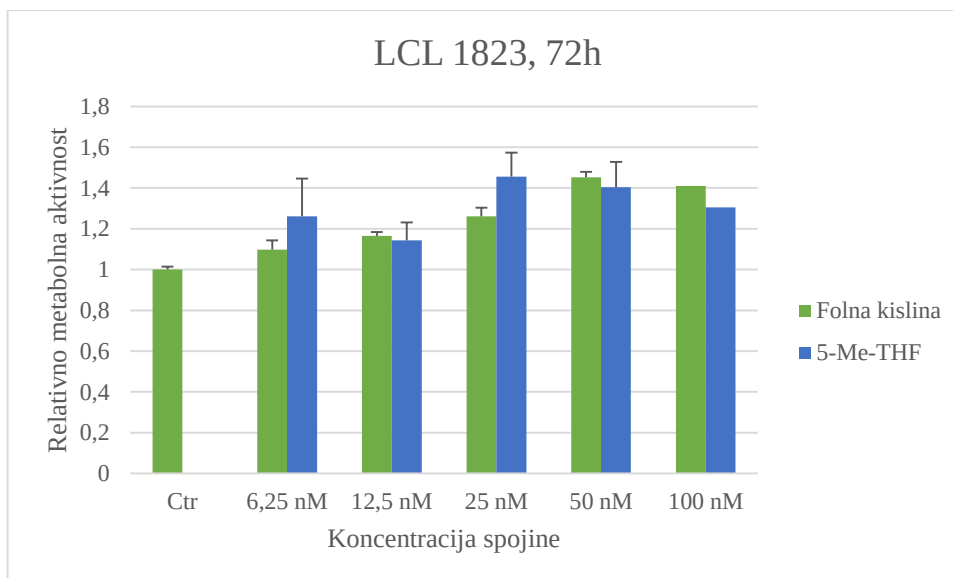
4.1 ŠTUDIJA METABOLNE AKTIVNOSTI

LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ Z RAZLIČNIMI KOMBINACIJAMI POLIMORFIZMOV V GENIH FOLATNEGA CIKLA

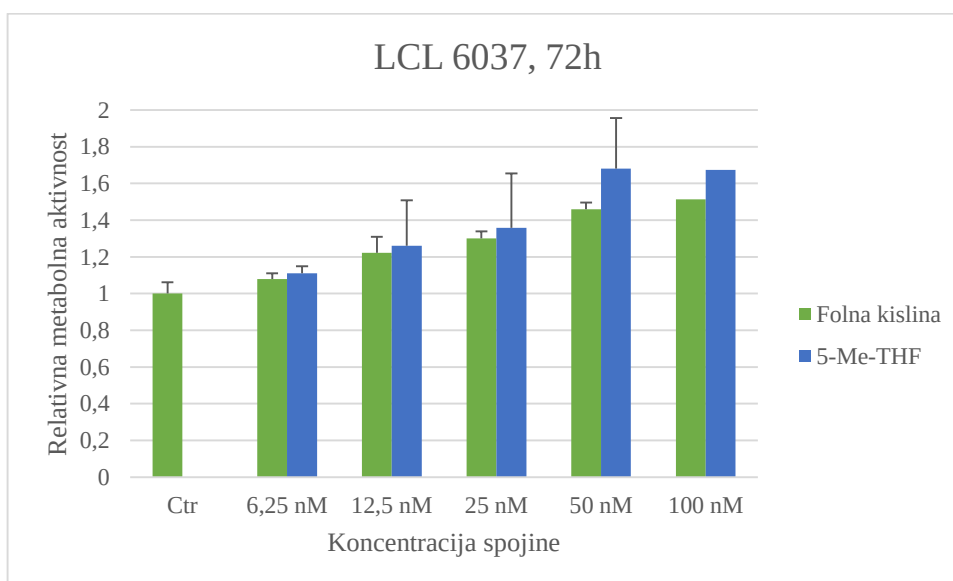
Najprej smo rezultate metabolne aktivnosti LCL izbranih polimorfizmov v genih folatnega cikla (Preglednica I) uredili v programu Excel, izračunali smo povprečne vrednosti treh bioloških ponovitev ter standardni odklon. Rezultati za posamezno celično linijo so grafično predstavljeni na slikah spodaj (slike 8–13). Grafični prikaz metabolne aktivnosti za posamezne LCL nam je pomagal pri izboru nadaljnjih statističnih pristopov, saj je bil opazen trend naraščajoče metabolne aktivnosti glede na uporabljeno spojino (FA, 5-Me-THF) in koncentracijo spojine (6,5 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM).



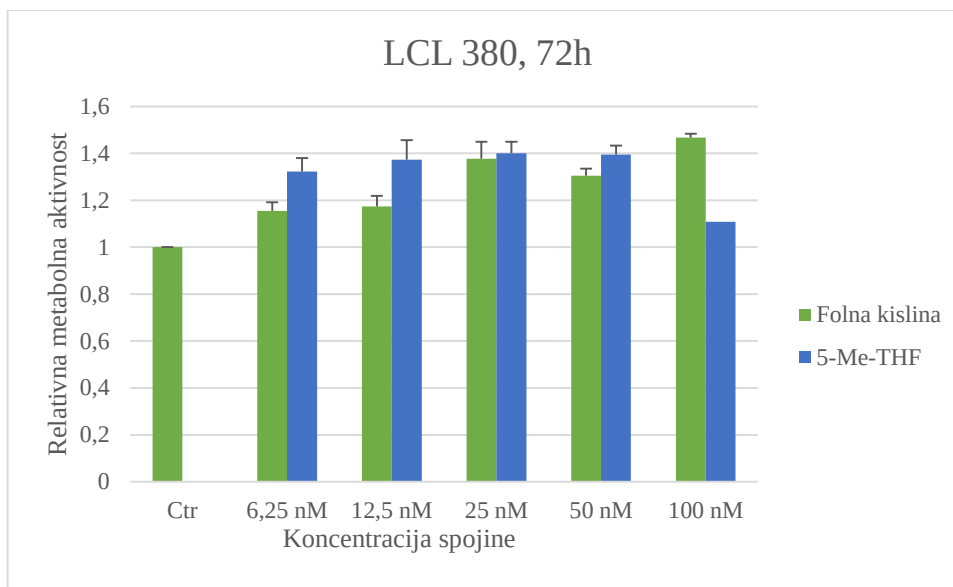
Slika 8: Stolpični diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 1516 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline ali 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.



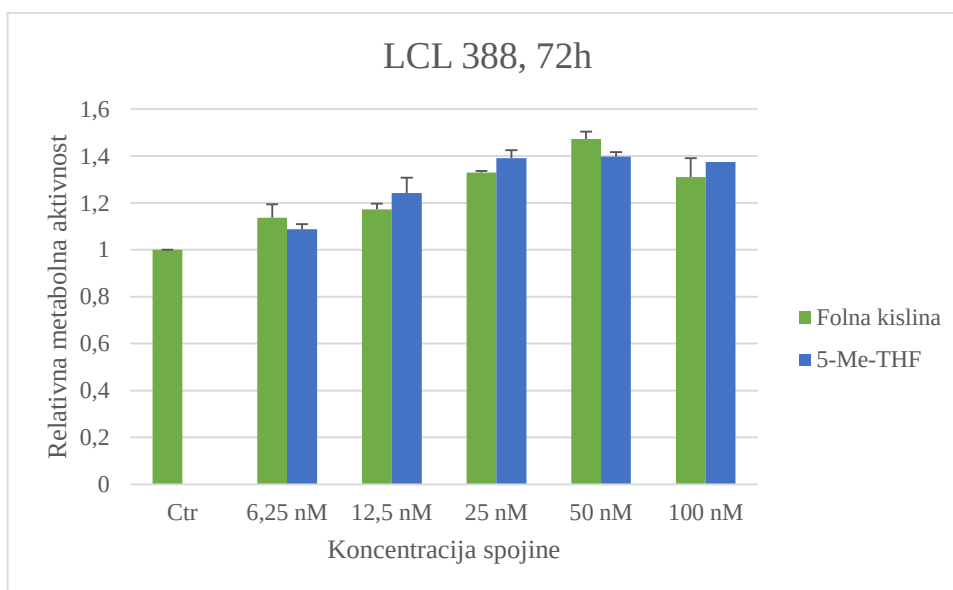
Slika 9: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 1823 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.



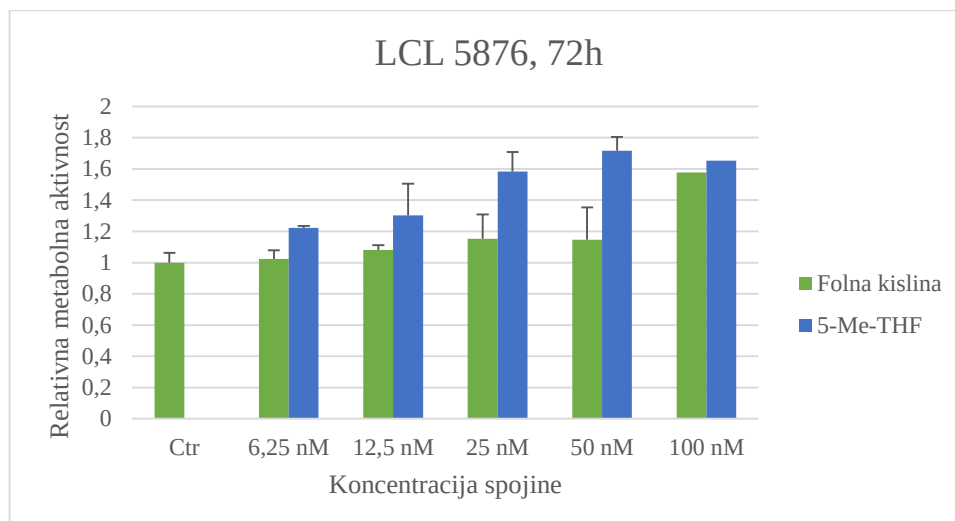
Slika 10: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 6037 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.



Slika 11: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 380 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.



Slika 12: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 388 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.

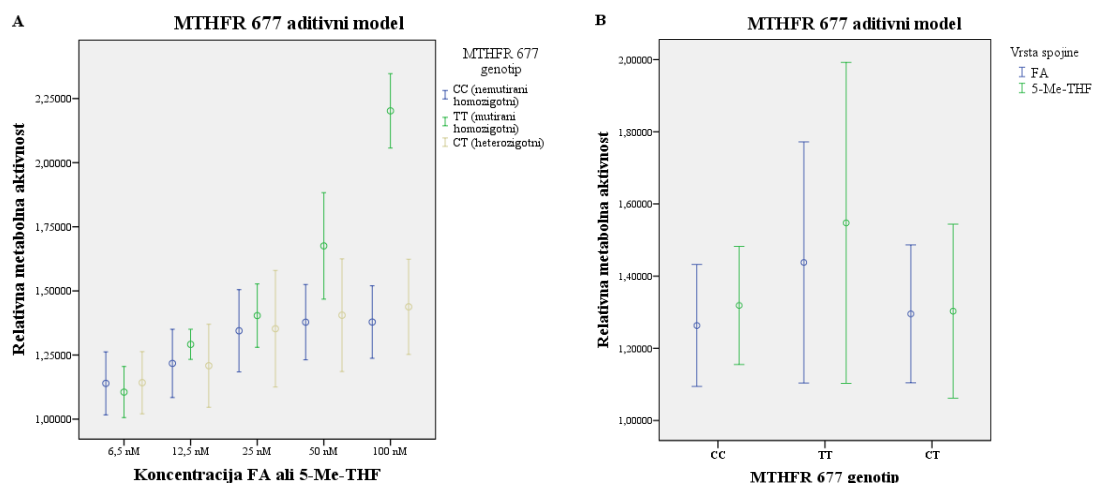


Slika 13: Stolpčni diagram prikazuje relativno metabolno aktivnost LCL 5876 po 72 urah pri različnih koncentracijah folne kisline in 5-Me-THF. Ctr – kontrola brez dodatka folne kisline ali 5-Me-THF.

Z uporabo parametričnega testa večfaktorske analize varianc in dvosmerne ANOVA-e, smo želeli preveriti učinek vrste spojine in genotipov oziroma učinek koncentracije spojine in genotipov na metabolno aktivnost LCL. Želeli smo ugotoviti tudi učinek interakcije med opisanimi neodvisnimi spremenljivkami. Med neodvisne spremenljivke spadajo: vrsta spojine (FA, 5-Me-THF), koncentracija spojine (6,5 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM) in genotip (*MTHFR* 677, *MTHFR* 1298, *MTRR*, *MTHFD1*, *BHMT*, *GNMT*, *DNMT3B*, *FPGS*, *DHFR*, *SLC19A1*). Genotipe smo kodirali kot aditiven, recesiven in dominanten genetski model. Pri aditivnem modelu smo genotipe razvrstili v tri skupine: nemutiran homozigotni genotip, mutiran homozigotni genotip in heterozigotni genotip. Da bi preverili, ali je prisoten dominantno-recesivni vpliv polimorfizmov, smo oblikovali tudi dominantni in recesivni model. Genotipe smo pri dominantnem modelu razvrstili v dve kategoriji: nemutirani homozigotni genotip in mutirani homozigotni + heterozigotni genotip. Pri recesivnem modelu smo podobno kot pri dominantnem modelu genotipe razvrstili v dve kategoriji: nemutirani homozigotni + heterozigotni genotip in mutirani homozigotni genotip. Poleg v zgoraj omenjene modele razvrstitve smo *MTHFR* genotipe na podlagi rezultatov genotipizacije *MTHFR* 677 (rs1801133) in *MTHFR* 1298 (rs1801131) razvrstili v dve kategoriji glede na predvideno encimsko aktivnost. Oblikovali smo kategorijo genotipov s predvideno encimsko aktivnostjo > 60 % in kategorijo genotipov s predvideno encimsko aktivnostjo < 60 %. Predvidena encimska aktivnost *MTHFR* < 60 % je predvidena za kombinaciji genotipov: *MTHFR* 677 TT/ 1298 AA ter *MTHFR* 677 CT/ 1298 AC (11). Test

normalnosti porazdelitve podatkov je pokazal, da se podatki porazdeljujejo rahlo desno asimetrično. Prav tako je bila v nekaterih primerih kršena predpostavka o homogenosti varianc (Levenov test je pokazal signifikantne razlike). Za vsakega izmed genotipov in genetskih modelov (aditivni, recesivni, dominantni) smo izdelali ločen model dvosmerne ANOVA-e. V modelu dvosmerne ANOVA-e smo poleg genotipov vključili še spremenljivki vrsta spojine (FA, 5-Me-THF) in koncentracija spojine (6,5 nM; 12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM). Vrsta spojine ni imela signifikantnega vpliva na metabolno aktivnost celic v nobenem izmed modelov, koncentracija spojine pa je bila v večini modelov (*MTHFR* 677, *MTHFR* 1298, *MTHFR* encimska aktivnost, *MTHFD1*, *BHMT*, *GNMT*, *DNMT3B*, *FPGS*) v pozitivni korelaciji z metabolno aktivnostjo celic. V nadeljevanju bomo predstavili posamezne ANOVA modele glede na genotip.

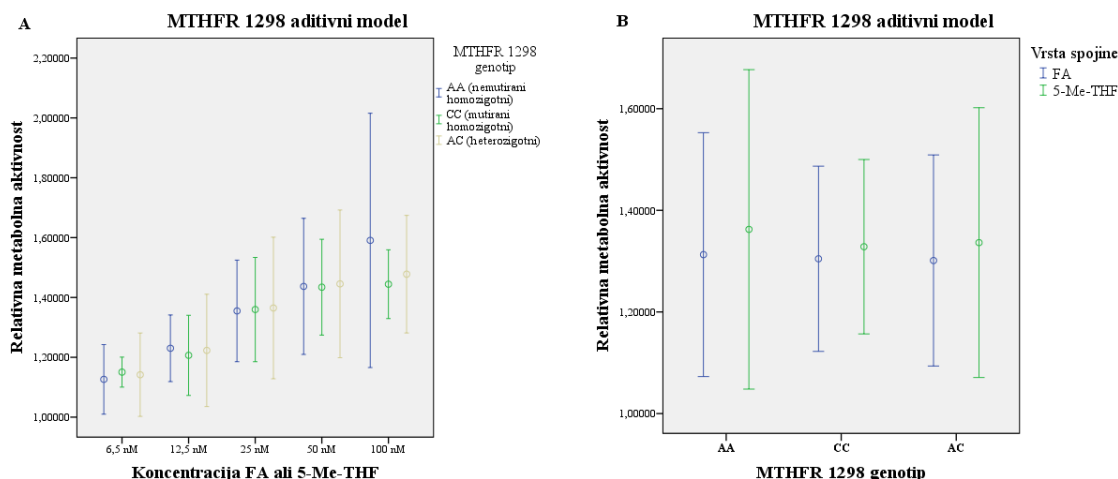
Koncentracija spojine ($p < 0,001$) in **genotip *MTHFR* 677** (aditivni; $p < 0,001$ in recesivni model; $p < 0,001$) signifikantno vplivata na metabolno aktivnost celic, medtem ko sama vrsta spojine ni signifikantni dejavnik metabolne aktivnosti LCL (aditivni, $p = 0,172$; recesivni, $p = 0,182$ in dominantni model, $p = 0,294$). Metabolna aktivnost celic pri najnižji koncentraciji 6 nM se statistično razlikuje od metabolne aktivnosti celic pri vseh višjih koncentracijah spojine. *MTHFR* 677 je pomemben dejavnik metabolne aktivnosti celic, signifikantno pomembna razlika v metabolni aktivnosti je prisotna med pari: nemutirani homozigot (CC) in mutirani homozigot (TT) ($p < 0,001$) ter mutirani homozigot (TT) ter heterozigot (CT) ($p < 0,001$). Prisotna je tudi interakcija med koncentracijo spojine in genotipom *MTHFR* 677 (aditivni, $p < 0,001$ in recesivni model, $p < 0,001$). Iz grafa (Slika 14) lahko razberemo, da relativna metabolna aktivnost celic raste z naraščajočo koncentracijo spojine pri vseh treh *MTHFR* 677 genotipih, vendar veliko bolj izrazito pri genotipu TT (Slika 14A). Različne koncentracije spojine imajo drugačen vpliv na metabolno aktivnost celic z različnimi genotipi *MTHFR* 677. Čeprav je viden trend večje metabolne aktivnosti celic ob dodatku 5-Me-THF, pa ta razlika ni statistično značilna (Slika 14B).



Slika 14: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFR 677.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa MTHFR 677. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa MTHFR 677 in vrste spojine.

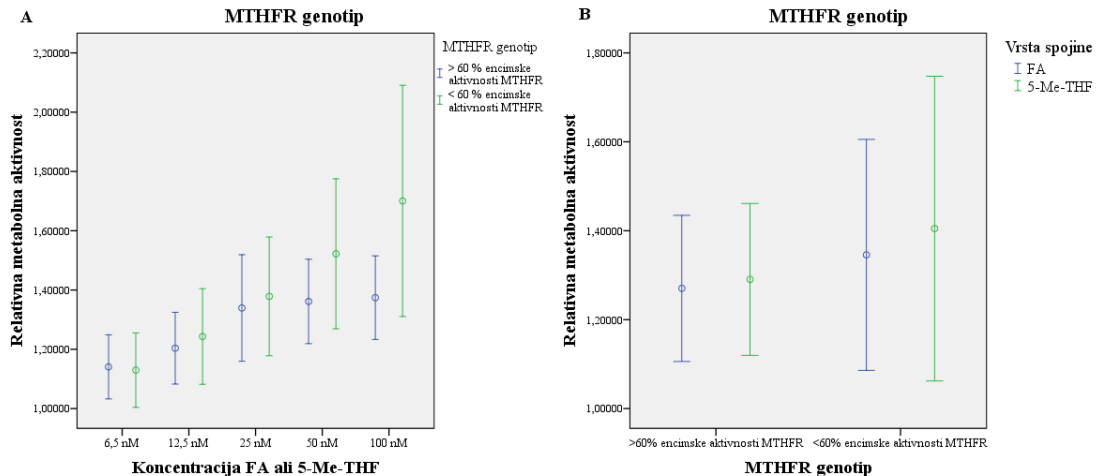
Pri **genotipu MTHFR 1298** nismo ugotovili statistično pomembnega vpliva genotipa (aditivni, $p = 0,833$; recesivni, $p = 0,797$ in dominantni model, $p = 0,616$) in vrste spojine (aditivni, $p = 0,405$; recesivni, $p = 0,520$ in dominantni model, $p = 0,302$) na metabolno aktivnost celic. Prav tako ni prisotne interakcije med vrsto spojine in genotipom (aditivni, $p = 0,969$; recesivni, $p = 0,850$ in dominantni model, $p = 0,814$) ter koncentracijo spojine in genotipom (aditivni, $p = 0,971$; recesivni, $p = 0,944$ in dominantni model, $p = 0,688$). Vendar je prisoten signifikantni vpliv koncentracije spojine za vse tri modele genotipa MTHFR 1298 ($p < 0,001$). Iz grafa lahko vidimo, da ima nemutirani homozigotni genotip (AA) največjo metabolno aktivnost celic, sledi mu heterozigotni genotip (AC), mutirani homozigotni genotip (CC) pa ima najnižje vrednosti za metabolno aktivnost celic, vendar le pri visoki koncentraciji FA oziroma 5-Me-THF (Slika 15A). Tudi tu je viden trend višje metabolne aktivnosti celic po dodatku 5-Me-THF v primerjavi s FA, vendar razlika ni statistično značilna.



Slika 15: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFR 1298.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa MTHFR 1298. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa MTHFR 1298 in vrste spojine.

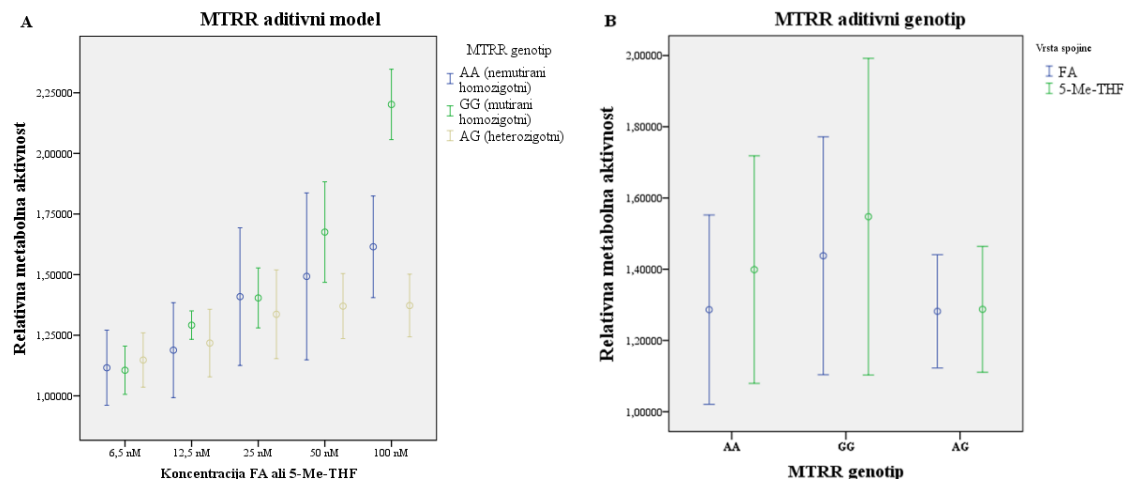
Statistično značilen vpliv je bil prisoten pri **kombinaciji MTHFR genotipov 677 in 1298 glede na pričakovano encimsko aktivnost** ($p = 0,015$) in koncentraciji spojine ($p < 0,001$), medtem ko vrsta spojine nima statistično značilnega vpliva na metabolno aktivnost celic. Uspeli smo dokazati, da je metabolna aktivnost celic statistično značilno večja pri MTHFR genotipu z $< 60\%$ encimske aktivnosti, kar še posebej pride do izraza pri koncentraciji FA oziroma 5-Me-THF nad 25 nM. Prisotna je statistično značilna interakcija med genotipom in koncentracijo spojine ($p = 0,007$), kar nakazuje, da imajo različne koncentracije spojine drugačen vpliv na metabolno aktivnost celic z genotipom, z encimsko aktivnostjo manjšo ali večjo kot 60 %. Iz grafa je razvidno, da je pri višjih koncentracijah spojine metabolna aktivnost celic pri MTHFR genotipu z $> 60\%$ encimske aktivnosti MTHFR izrazito nižja v primerjavi z genotipom MTHFR z $< 60\%$ encimske aktivnosti. Statistično značilna interakcija med koncentracijo spojine in vrsto spojine ni prisotna ($p = 0,918$) (Slika 16).



Slika 16: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFR (predvidena encimska aktivnost > 60 % in < 60 %).

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa MTHFR encimska aktivnost. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa MTHFR encimska aktivnost in vrste spojine. Kombinacija MTHFR genotipov 677 in 1298 glede na pričakovano encimsko aktivnost: MTHFR encimska aktivnost < 60 %: MTHFR 677 TT/ MTHFR 1298 AA + MTHFR 677 CT/ MTHFR 1298 AC. MTHFR encimska aktivnost > 60 %: vse ostale kombinacije, MTHFR 677 CC/ MTHFR 1298 AA/AC/CC + MTHFR 677 CT/ MTHFR 1298 AC.

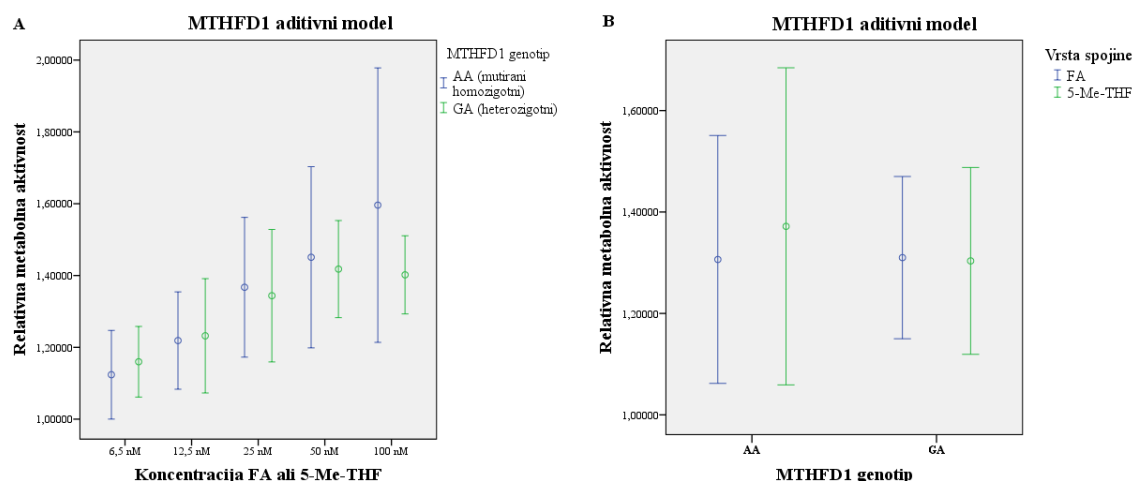
Na metabolno aktivnost statistično pomembno vplivata **genotip MTRR** (aditivni, $p < 0,001$ in recisivni model, $p < 0,001$) in koncentracija spojine ($p < 0,001$). Statistično značilna razlika v metabolni aktivnosti je prisotna med nemutiranim (AA) in mutiranim homozigotnim genotipom (GG) ($p = 0,003$) ter mutiranim homozigotnim (GG) in heterozigotnim genotipom (AG) ($p < 0,001$). Prisotna je statistično značilna interakcija med genotipom MTRR in koncentracijo spojine (aditivni, $p < 0,001$ in recisivni model, $p < 0,001$), kar nakazuje, da imajo različne koncentracije spojine drugačen vpliv na metabolno aktivnost celic s specifičnim genotipom MTRR. Celice z mutiranim homozigotnim genotipom (GG) imajo v povprečju višjo metabolno aktivnost kot tiste s heterozigotnim (AG) ali homozigotnim genotipom (AA) divjega tipa, še posebej pri višjih koncentracijah FA ali 5-Me-THF (Slika 17A). Trend večje metabolne aktivnosti je prisoten pri tretiranju celic s 5-Me-THF v primerjavi s FA, vendar ta razlika ni signifikantno značilna (aditivni, $p = 0,103$; recisivni, $p = 0,182$ in dominantni model, $p = 0,194$).



Slika 17: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTRR.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa MTRR. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa MTRR in vrste spojine.

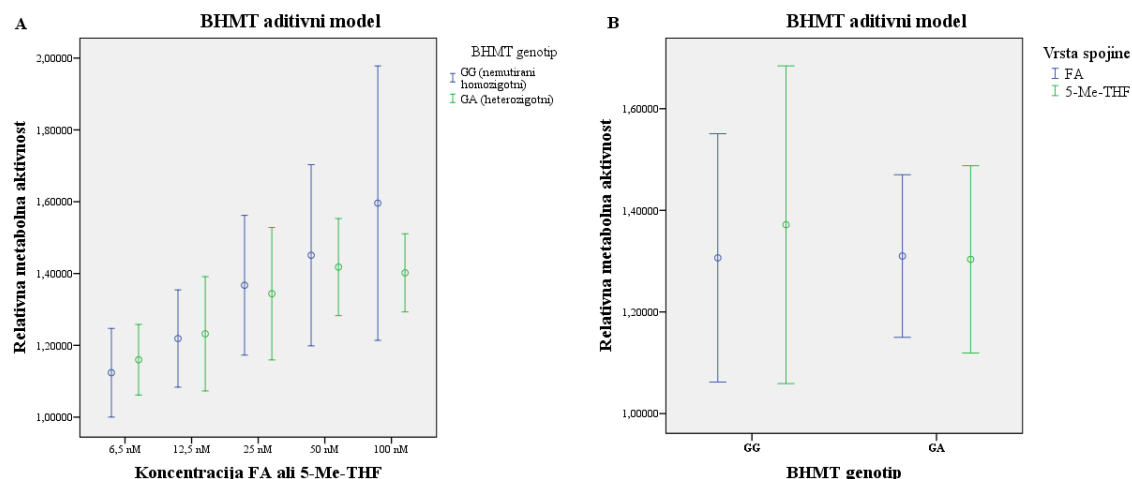
Pri genotipu **MTHFD1** vrsta spojine (aditivni, $p = 0,476$; recesivni, $p = 0,476$ in dominantni model, $p = 0,304$) in genotip ($p = 0,434$) signifikantno ne vplivata na metabolno aktivnost celic. Statistično pomembna razlika v metabolni aktivnosti je bila določena za koncentracijo spojine ($p < 0,001$). Dominantnega modela nismo mogli uporabiti, saj nobena izmed LCL ni imela nemutiranega homozigotnega genotipa (GG). Koncentracija spojine ima različen vpliv na metabolno aktivnost celic, če med sabo primerjajmo mutirani homozigotni (AA) in heterozigotni (GA) genotip. Pri višjih koncentracijah spojine (≥ 25 nM) imajo celice z mutiranim homozigotnim genotipom (AA) višjo metabolno aktivnost kot tiste s heterozigotnim genotipom (GA), vendar vpliv genotipa na metabolno aktivnost celic ni signifikanten (Slika 18A). Višja metabolna aktivnost celic z mutiranim homozigotnim genotipom (AA) je opažena pri tretiranju celic s 5-Me-THF v primerjavi s FA. Medtem ko je pri celicah s heterozigotnim genotipom (GA) opažena višja metabolna aktivnost celic pri tretiranju s FA v primerjavi s 5-Me-THF, vendar vpliv vrste spojine na metabolno aktivnost celic ni signifikanten (Slika 18B). Statistično značilna interakcija med koncentracijo spojine in genotipom **MTHFD1** ($p = 0,287$) ni prisotna.



Slika 18: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa MTHFD1.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa MTHFD1. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa MTHFD1 in vrste spojine.

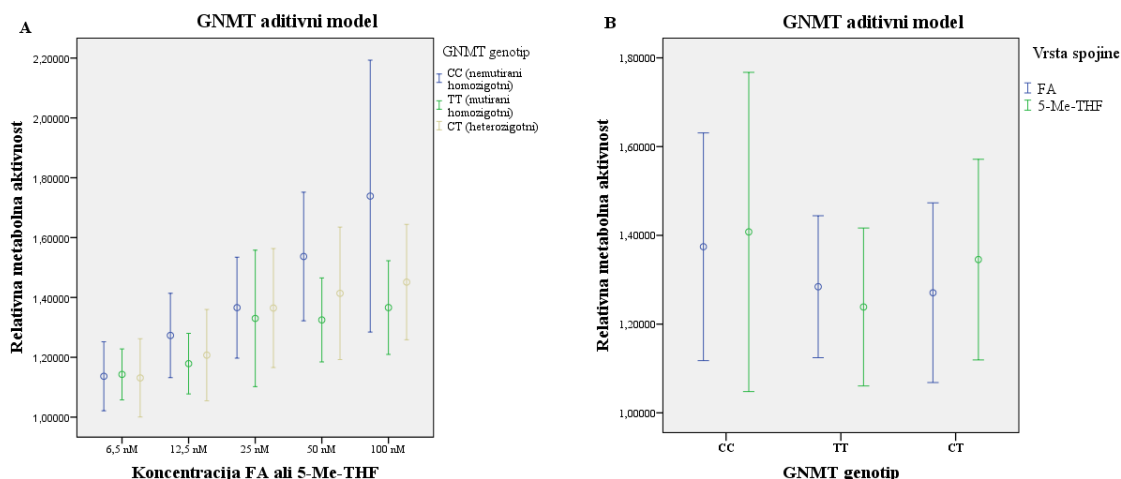
Pri genotipu **BHMT** na metabolno aktivnost celic statistično značilno vpliva koncentracija spojine ($p < 0,001$). Vpliv genotipa **BHMT** ($p = 0,434$) in vrste spojine (aditivni, $p = 0,476$; recesivni, $p = 0,304$ in dominantni model, $p = 0,476$) na metabolno aktivnost celic ni bil statistično značilen. Ker med izbranimi LCL ni bilo nobene linije s homozigotnim mutiranim genotipom (AA), recesivnega modela ne moremo uporabiti. Prav tako ni bilo izmerjene statistično značilne interakcije med vrsto spojine in genotipom **BHMT** ($p = 0,384$) ter koncentracijo spojine in genotipom **BHMT** ($p = 0,287$). Pri višjih koncentracijah spojine (≥ 25 nM) (Slika 19A) je metabolna aktivnost celic višja pri nemutiranem homozigotnem genotipu (GG) v primerjavi s heterozigotnim genotipom (GA), vendar razlika ni statistično značilna. Pri tretiranju celic s 5-Me-THF je opažena višja metabolna aktivnost celic pri nemutiranem homozigotnem genotipu (GG) v primerjavi s heterozigotnim genotipom (GA) (Slika 19B). Medtem ko je pri tretiranju celic s FA višja metabolna aktivnost celic opažena pri heterozigotnem genotipu (GA) v primerjavi z nemutiranim homozigotnim genotipom (GG), vendar ta razlika ni statistično značilna (Slika 19B).



Slika 19: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa BHMT.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa BHMT. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa BHMT in vrste spojine.

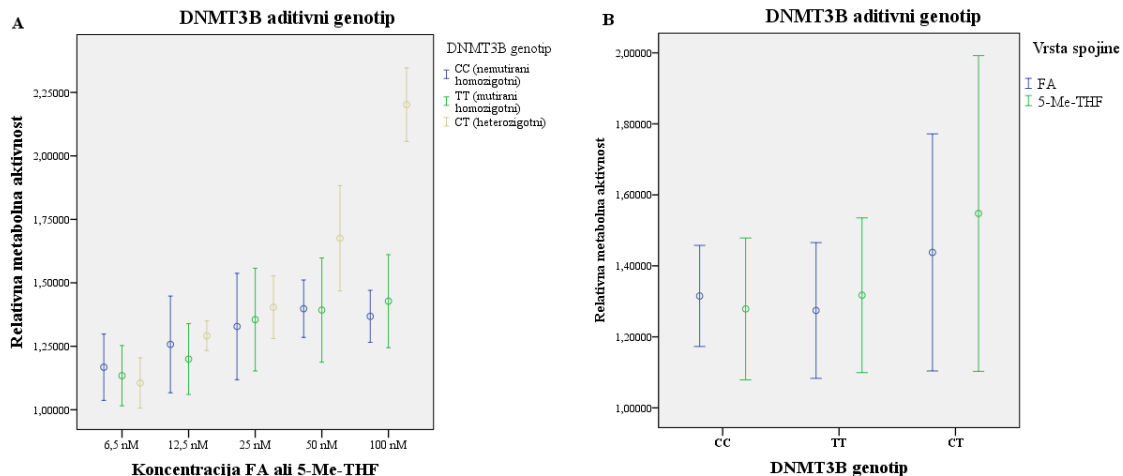
Statistično pomembna razlika v metabolni aktivnosti celic glede na genotip **GNMT** je prisotna za aditivni ($p = 0,048$) in dominantni ($p = 0,021$) model. Na metabolno aktivnost statistično značilno vpliva tudi koncentracija spojine ($p < 0,001$), medtem ko vrsta spojine nima statističnega vpliva (aditivni, $p = 0,622$; recesivni, $p = 0,900$ in dominantni model, $p = 0,351$). Interakcija genotipa **GNMT** in koncentracije spojine je statistično značilna pri dominantnem modelu ($p = 0,029$). Iz grafa (Slika 20A) lahko razberemo, da je pri višjih koncentracijah spojine (> 25 nM) porast metabolne aktivnosti celic izrazitejši pri nemutiranem homozigotnem genotipu (CC). Čeprav vpliv vrste spojine ni statistično značilen, imajo celice mutiranega homozigotnega genotipa (TT) višjo metabolno aktivnost pri dodatku FA v primerjavi s 5-Me-THF. Medtem ko imajo celice nemutiranega homozigotnega genotipa (CC) in heterozigotnega genotipa (CT) višjo metabolno aktivnost pri dodatku 5-Me-THF v primerjavi s FA (Slika 20B).



Slika 20: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa GNMT.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa GNMT. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa GNMT in vrste spojine.

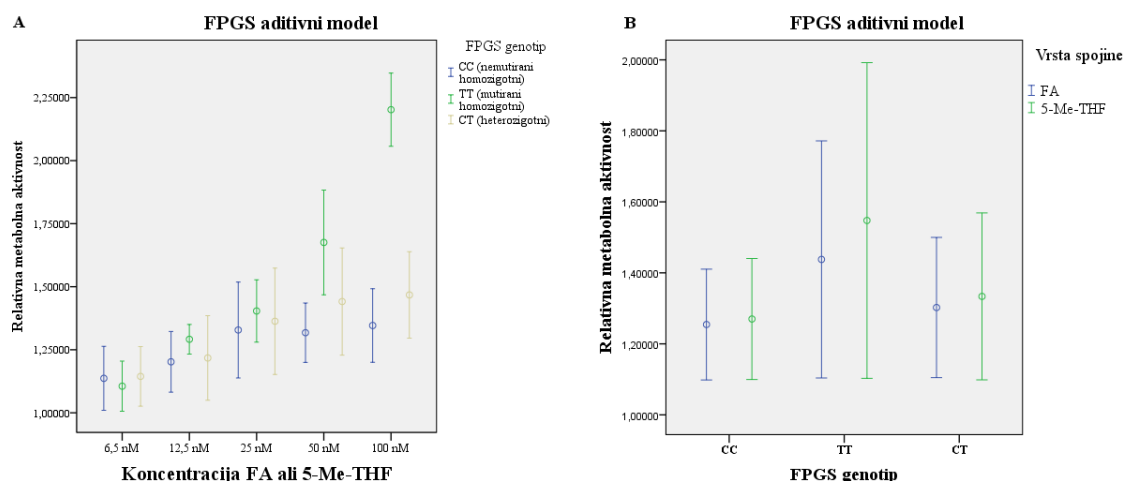
Pri **DNMT3B** ni prisotnega signifikantnega vpliva vrste spojine na metabolno aktivnost celic, vendar je vpliv genotipa **DNMT3B** na metabolno aktivnost celic signifikanten (aditivni, $p = 0,001$ in recesivni model, $p = 0,021$). Med nemutiranim homozigotnim (CC) in heterozigotnim genotipom (CT) ($p = 0,011$) ter mutiranim homozigotnim (TT) in heterozigotnim genotipom (CT) ($p = 0,001$) je prisotna signifikantna razlika v metabolni aktivnosti celic glede na koncentracijo spojine. Iz grafa (Slika 21A) je razvidno, da imajo heterozigoti (CT) višjo metabolno aktivnost kot ostala dva genotipa, še posebej pri višjih koncentracijah spojine, vendar ni prisotne signifikantne razlike glede na vrsto spojine (aditivni, $p = 0,400$; recesivni, $p = 0,351$ in dominantni model, $p = 0,846$) (Slika 21B). Ugotovili smo, da ima koncentracija spojine vpliv v aditivnem ($p < 0,001$), recesivnem ($p = 0,001$) in dominantnem modelu ($p < 0,001$). Prav tako je prisotna interakcija med genotipom in koncentracijo spojine, ki je signifikantna za aditivni ($p < 0,001$) in recesivni model kodiranja genotipa **DNMT3B** ($p = 0,029$). Iz grafa (Slika 21B) lahko vidimo, da imajo celice z nemutiranim homozigotnim genotipom (CC) višjo metabolno aktivnost, kadar so tretirane s FA, v primerjavi s 5-Me-THF ter da imajo celice s heterozigotnim (CT) in mutiranim homozigotnim genotipom (TT) višjo metabolno aktivnost, kadar so tretirane s 5-Me-THF v primerjavi s FA, vendar razlike niso statistično značilne.



Slika 21: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa DNMT3B.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa DNMT3B. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa DNMT3B in vrste spojine.

Na metabolno aktivnost izbranih LCL značilno vpliva tudi **genotip FPGS** (aditiven, $p < 0,001$; recesiven, $p < 0,001$ in dominanten model, $p = 0,017$), statistično značilna razlika v metabolni aktivnosti celic je prisotna med nemutiranim (CC) in mutiranim (TT) homozigotnim genotipom ($p < 0,001$) ter mutiranim homozigotnim (TT) in heterozigotnim (CT) genotipom ($p < 0,001$). Iz grafa je razvidno (Slika 22B), da je metabolna aktivnost celic najvišja pri mutiranem homozigotnem (TT) genotipu FPGS, medtem ko učinek vrste spojine na metabolno aktivnost ni bil signifikanten (aditivni, $p = 0,212$; recesivni, $p = 0,182$ in dominantni model, $p = 0,427$). Prisoten pa je signifikanten vpliv koncentracije spojine na metabolno aktivnost ($p < 0,001$) (Slika 22A), prav tako je prisotna statistično značilna interakcija med genotipom encima FPGS (aditivni, $p < 0,001$; recesivni, $p < 0,001$ in dominantni model, $p = 0,029$) ter koncentracijo spojine (Slika 22A). Iz grafa (Slika 22A) lahko razberemo, da je pri višjih koncentracijah spojine metabolna aktivnost celic mutiranega homozigotnega genotipa (TT) signifikantno večja v primerjavi z nemutiranim homozigotnim genotipom (CC) ($p < 0,001$) ali heterozigotnim genotipom (CT) ($p < 0,001$). Na sliki 22B je viden trend večje metabolne aktivnosti pri tretiranju celic s 5-Me-THF v primerjavi s FA, vendar ta razlika ni statistično značilna.



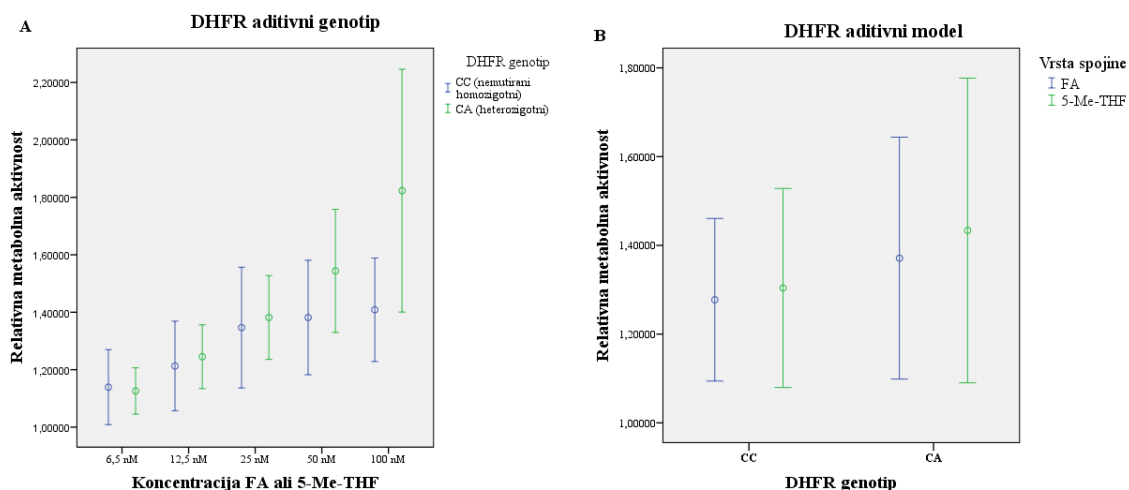
Slika 22: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa FPGS.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa FPGS. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa FPGS in vrste spojine.

Na metabolno aktivnost celic statistično značilno vpliva tudi **genotip DHFR** (aditiven, $p = 0,007$ in dominanten model, $p = 0,007$), medtem ko recesivnega modela ne moremo uporabiti, saj nobena izmed LCL ni imela mutiranega homozigotnega genotipa (AA). Na metabolno aktivnost celic signifikantno vpliva koncentracija spojine ($p < 0,001$) in prihaja do interakcije med koncentracijo spojine in genotipom *DHFR* ($p = 0,001$). Celice s heterozigotnim genotipom (CA) imajo v povprečju višjo metabolno aktivnost kot tiste z nemutiranim homozigotnim genotipom (CC) (Slika 23A), še posebej pri višjih koncentracijah spojine. Trend višje metabolne aktivnosti celic po dodatku 5-Me-THF v primerjavi s FA je viden na Sliki 23B, vendar razlika ni statistično značilna ($p = 0,276$).

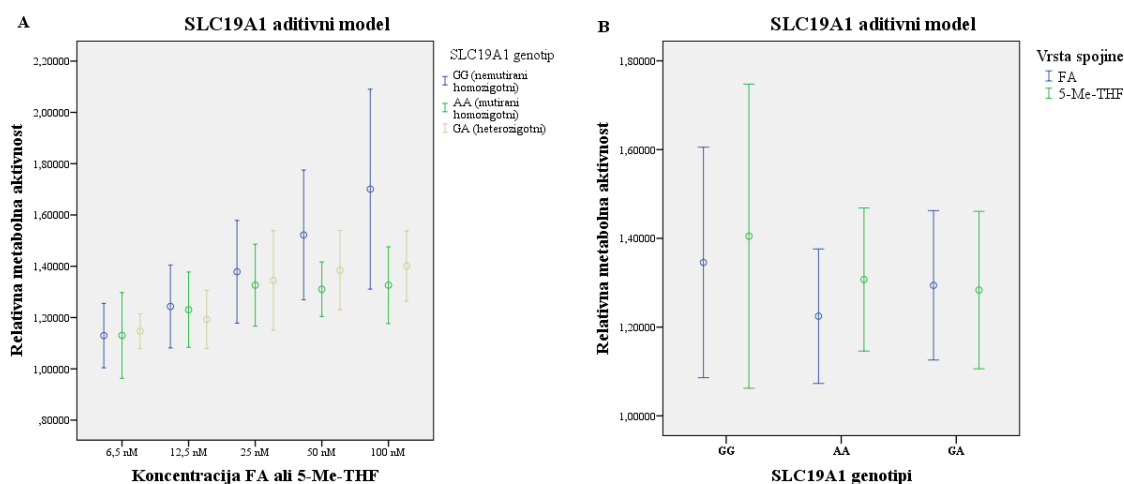
Statistično značilne razlike so prisotne tudi pri polimorfizmu prenašalca **SLC19A1**. Statistično pomembna razlika v metabolni aktivnosti celic je prisotna glede na koncentracijo spojine v vseh genetskih modelih *SLC19A1* (aditivni, recesivni in dominantni; $p < 0,001$). Prav tako ima genotip *SLC19A1* značilen vpliv na metabolno aktivnost celic v aditivnem ($p = 0,002$), recesivnem ($p = 0,043$) in dominantnem modelu ($p < 0,001$). V aditivnem modelu genotipa *SLC19A1* je metabolna aktivnost celic z nemutiranim homozigotnim genotipom (GG) statistično značilno ($p = 0,032$) večja v primerjavi z mutiranim homozigotnim genotipom (AA) pri višjih koncentracijah spojine (≥ 25 nM) (Slika 24A). Prav tako je statistično značilna razlika v metabolni aktivnosti prisotna, če med seboj primerjamo nemutirani homozigotni in heterozigotni genotip ($p = 0,044$) (Slika 24A). Pri genotipu

SLC19A1 prihaja do interakcije med koncentracijo spojine in genotipom (dominantni model, $p = 0,007$). Kljub opaznemu trendu večje metabolne aktivnosti celic po dodatku 5-Me-THF pa statistično značilnega vpliva vrste spojine (aditivni, $p = 0,311$; recesivni, $p = 0,292$ in dominantni model, $p = 0,303$) nismo dokazali (Slika 24B).



Slika 23: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa DHFR.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa DHFR. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa DHFR in vrste spojine.



Slika 24: Grafični prikaz povprečne relativne metabolne aktivnosti LCL s standardno deviacijo v odvisnosti od koncentracije spojine, vrste spojine (folna kislina (FA) ali 5-metiltetrahidrofolat (5-Me-THF)) in genotipa SLC19A1.

A) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od koncentracije spojine in genotipa SLC19A1. B) Metabolna aktivnost LCL v odvisnosti od genotipa SLC19A1 in vrste spojine.

4.2 ŠTUDIJA PAROV OTROK Z OFC IN ZDRAVIH SOROJENCEV

4.2.1 OKOLJSKI DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OFC

V tem podglavju bomo predstavili statistične analize podatkov, pridobljene z anketnim vprašalnikom. V ta del analize je bilo vključenih 122 parov otrok z OFC in njihovih zdravih sorojencev. Zaradi boljše preglednosti so rezultati ločeno prikazani za numerične spremenljivke (Preglednica VII) in ločeno za kategorične (Preglednica VIII).

Povprečna **starost matere ob zanositvi** je bila v skladu s pričakovanji statistično značilno višja ($p = 0,009$) ob rojstvu otroka z OFC (29,27 leta) kot ob rojstvu zdravega sorojenca (27,75 leta). Statistično značilne razlike so bile opažene tudi v **letnici rojstva otroka** z ali brez OFC ($p = 0,013$) (Preglednica VII). Pri OFC izidu nosečnosti je letnica rojstva značilno višja (kronološko kasnejša) v primerjavi z letnico rojstva zdravega sorojenca. Znano je, da pojavitev prirojenih okvar narašča z naraščanjem starosti matere ob zanositvi. V naši študiji smo želeli opredeliti vpliv starosti matere ob zanositvi na pojav OFC. Opazili smo, da je starost matere v povprečju za 1–2 leti višja ob OFC nosečnosti v primerjavi s starostjo ob normalni nosečnosti. Sklepamo, da je možnost nastanka OFC večja v kasnejših nosečnostih, kar se odraža z značilno višjo letnico OFC otroka in starejšo mamo. Pomembnost kronološkega sosledja rojstev na pojavnost OFC je preučeval Viera s sodelavci. Ugotovil je povezavo med naraščajočim vrstnim redom rojstev (družine s 4 ali več otroki) in pojavnostjo OFC. Otroci s kasnejšim vrstnim redom rojstva imajo večjo verjetnost za pojavitev OFC (61, 86). Tolorova s sodelavci poroča, da se z vsako naslednjo nosečnostjo tveganje za razvoj obraznih malformacij poveča tudi do 5 % (48). Vpliv starosti matere na pojavnost OFC pri otroku so preučevale številne študije, vendar so si rezultati precej neskladni. Določene študije vpliva starosti matere na pojavnost OFC niso dokazale (63) ali so v povezavi z nizkim SES prišli njihovi avtorji do zaključkov, da imajo mlade matere značilno višje tveganje za OFC (61, 62). Herkrat in sodelavci so v svoji raziskavi opazili, da imajo ženske, ki so stare 40 let in več, 1,5-krat večjo verjetnost za rojstvo otroka z OFC (87). Prav tako so Bille s sodelavci in Gil da Silva Lopez s sodelavci v njunih raziskavah odkrili pomemben vpliv starosti matere in očeta na razvoj OFC (59, 64). Bille s sodelavci je preučeval matere v starostnih skupinah od 20 let do 40 let in očete v starostnih skupinah od 20 let do 50 let. Ugotovil je, da se glede na materino starost dejavnik tveganja v desetih letih za CL in CLP

poveča 1,2-krat in za CP 1,16-kart. Glede na očetovo starost se dejavnik tveganja za CL in CLP poveča 1,12-krat in za CP 1,2-krat (59).

Med obema skupinama, zdravo in OFC nosečnostjo, nismo opazili statistično značilne razlike v **telesni teži matere ob zanositvi** (Preglednica VII). Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Yong s sodelavci, ki prav tako ni opazil vpliva prekomerne telesne teže med nosečnostjo v povezavi z nižjim SES in pojavitvijo OFC (58). Nekateri avtorji predpostavljajo, da debelost s prekomernim kopičenjem maščobe in vzpostavitev kroničnega vnetja, pri katerem se sproščajo vnetni citokini iz adipocitov, v času nosečnosti lahko pomembno vpliva na embrionalni razvoj. Zaradi patološkega porasta izločanja citokinov iz adipocitov pride do infiltracije imunskih celic v maščobno tkivo, kar v telesu vodi do blagega kroničnega vnetja. Prav tako debelost na razvoj OFC vpliva indirektno; v maščobnem tkivu se lahko nakopičijo različni polutanti in toksini, kot na primer dioksin, ki je dokazan dejavnik tveganja nastanka CP pri miših. V času nosečnosti pride do sproščanja nakopičenih toksinov iz maščobnega tkiva, kar vpliva na razvoj ploda (88).

Preglednica VII: Prikaz srednjih vrednosti preučevanih numeričnih spremenljivk in rezultatov osnovne statistične analize.

*Pri starosti matere ob zanositvi (normalna porazdelitev) smo kot mero srednje vrednosti uporabili povprečno vrednost $\pm$ standardna deviacija, za ostali dve spremenljivki pa mediano z navedeno minimalno in maksimalno vrednostjo. *Za testiranje vpliva starosti (normalna porazdelitev) smo uporabili parametrični odvisni t-test, za ostali dve spremenljivki (nenormalna porazdelitev) pa Wilcoxon Rank test za odvisne vzorce. N = 122.*

Spremenljivka	Srednja vrednost		p*
	Zdrava nosečnost	OFC nosečnost	
Letnica rojstva otroka	2006 (1987; 2013)	2007 (1991; 2014)	0,013
Starost matere ob zanositvi {leta}	27,75 $\pm$ 0,51	29,27 $\pm$ 0,44	0,009
Teža matere ob zanositvi {kg}	62 (40; 103)	61 (48; 100)	0,131

Sledila je analiza nekaterih okoljskih dejavnikov tveganja za OFC, ki so razvrščeni v dve ali več kategorij, navedenih v Preglednici VIII. Statistično značilna razlika med zdravo in OFC nosečnostjo je bila prisotna pri jemanju zdravil (razen protiepileptičnih zdravil) med nosečnostjo ($p = 0,029$), zvišani telesni temperaturi ($> 38^{\circ}\text{C}$) v prvem trimesečju ($p = 0,002$) in rednostjo jemanja folatnih pripravkov ($p = 0,033$).

Sladkorna bolezen (tip 1 in 2) v času nosečnosti je znan dejavnik prirojenih nepravilnosti ploda. Prirojene okvare otrok se pri materah s sladkorno boleznijo pojavljajo približno 3- do 5-krat pogosteje v primerjavi z materami brez sladkorne bolezni (89). Ker prevalenca diabetesa v svetovni populaciji narašča, smo želeli preveriti njegov doprinos k razvoju OFC. Vpliva **prednosečniškega diabetesa** na pojavnost OFC nismo mogli oceniti, saj ni bilo nobene matere, ki bi imela ob zdravi ali OFC nosečnosti prisotno sladkorno bolezen (tip 1 in 2). O povečanem tveganju OFC ploda v povezavi s prednosečniško sladkorno boleznijo poročajo Spilson s sodelavci, ki so uspeli dokazati, da imajo sladkorne bolnice do 1,4-krat večje tveganje (67). Prav tako je o 2,2-krat večjem tveganju za CL in CLP poročal Miller s sodelavci (88). Kljub temu da mehanizem teratogenega delovanja diabetesa ni dobro poznan, vemo, da ima pomembo vlogo hipoksičen in oksidativni stres, ki nastane zaradi materine hipoglikemije ali hiperglikemije v obdobju embriogeneze (67, 88). Pri preučevanju **nosečniškega (gestacijskega) diabetesa** nismo odkrili statistično pomembne povezave z OFC. Medtem ko Correa in sodelavci poročajo o 1,5-krat večjem tveganju za razvoj OFC pri materah z gestacijskim diabetesom, Miller s sodelavci in Janssen s sodelavci niso dokazali vpliva gestacijskega diabetesa (88, 90, 91). Razvoj gestacijskega diabetesa v drugi polovici nosečnosti pojasni nesignifikantni vpliv na razvoj OFC, ki se pri plodu razvije v prvih dveh mesecih nosečnosti (88).

Prav tako se **spol otroka** med zdravo in OFC nosečnostjo ni razlikoval. Čeprav so v brazilski populacijski študiji dokazali, da se CP pogosteje pojavlja pri ženskah, CL in CLP pa je pogostejša oblika OFC pri moškem spolu. Pri moškem spolu so ugotovili 2,2-krat večji dejavnik tveganja za CL v primerjavi s CP kot pri ženskem spolu (92). Do enakih izsledkov je prišel Mossey s sodelavci in dokazal, da je taka razporeditev med spoloma prisotna v vseh populacijah. Za kavkazijsko populacijo so določili razmerje med spoloma za CL/CLP, moški : ženska, ki znaša 2 : 1 (57, 93). Različno zastopanost oblik OFC med spoloma težko pojasnimo, sklepamo, da imajo še nepoznane razlike med spoloma v času embrionalnega razvoja vlogo pri orofacialnem razvoju. **Zvišana telesna temperatura (> 38 °C) v prvem trimesečju** ($p = 0,002$) je povezana s pojavom OFC, saj je delež tovrstnega dogodka višji pri OFC nosečnosti kot pri normalni nosečnosti, medtem ko ni bilo prisotnih signifikantnih razlik med zdravo in OFC nosečnostjo v **uporabi savne v prvem trimesečju nosečnosti**. Povišano telesno temperaturo med nosečnostjo uvrščamo med teratogene dejavnike. Povišana telesna temperatura je med nosečnostjo kar pogost pojav. V času nosečnosti naj bi bila približno vsaka peta nosečnica vsaj enkrat izpostavljena povišani telesni temperaturi.

Hipertermija v telesu inducira ekspresijo proteinov toplotnega šoka. Če odgovor na toplotni šok prevlada nad normalno celično aktivnostjo, lahko hipertermija vodi do nastanka prirojenih okvar ploda. Dreier je s sodelavci dokazal, da se pogostost prirojenih okvar ploda ob prisotnosti hipertermije v prvem trimesečju lahko poveča tudi do 3-krat (73). V naši študiji smo ugotovili, da je bila pri OFC nosečnosti skoraj 5-krat pogostejša povišana telesna temperatura v prvem trimesečju nosečnosti v primerjavi z zdravo nosečnostjo. Smiselno bi bilo, da bi v naš anketni vprašalnik vključili tudi vprašanje, ali so matere povišano telesno temperaturo v času nosečnosti zniževale.

Ugotovili smo tudi, da se med zdravo in OFC nosečnostjo pojavljajo statistično značilne razlike v **rednosti jemanja folatnih pripravkov** ($p = 0,033$). Pri OFC nosečnostih je bil opažen večji delež zmernega in nizkega vnosa v primerjavi z zdravo nosečnostjo. V času raziskave med otroki z OFC in njihovimi zdravimi sorojenci razlik nismo opazili pri: **jemanju folatnih pripravkov pred zanositvijo, jemanju folatnih pripravkov v prvem trimesečju in začetkom jemanja folatnih pripravkov v nosečnosti**. Z vprašalnikom smo želeli preveriti, ali je prisotna statistično pomembna razlika med zdravo in OFC nosečnostjo glede na **tip folatnih pripravkov, ki jih je mati jemala pred zanositvijo in v prvem trimesečju nosečnosti**. Zanimalo nas je, ali je prisotna statistično pomembna razlika med folno kislino in njeno aktivno obliko, metafolinom, ker pa nobena mati ni jemala metafolina, te spremenljivke nismo mogli preveriti. Prav tako nismo dokazali vpliva jemanja **drugih prehranskih dopolnil na nastanek OFC**. V skladu z literaturo smo v naši študiji pričakovali zaščitno vlogo folatnih in multivitaminskih pripravkov pri razvoju OFC. Statistično značilne razlike smo izmerili pri rednem jemanju folatnih pripravkov, kar nakazuje na pričakovani vpliv folata, vendar samega vpliva v naši populaciji nismo dokazali. Dobljene rezultate bi lahko pojasnili z naravo izpolnjevanja anketnega vprašalnika in majhnostjo vzorca, smiselno bi bilo nekoliko preoblikovati in dopolniti vprašanja o jemanju folatnih pripravkov. Zavedati se moramo, da je izpolnjevanje vprašanj temeljilo na lastni presoji in osebni validaciji mater. V nacionalni norveški študiji poročajo o zmanjšanem tveganju za nastanek OFC ob jemanju folatnih pripravkov v kombinaciji s folati bogato hrano za približno tretjino (94). Do podobnih zaključkov je prišla tudi Wilcoxonova raziskovalna skupina, ki je preiskovala zaščitni učinek folne kisline v zgodnji nosečnosti (95). Obrazne malformacije se razvijejo do 2. meseca nosečnosti, zato smo se osredotočili tudi na časovni okvir jemanja folatnih pripravkov. Pomembnost preskrbe matere s folno kislino do 4 tedne pred nosečnostjo in do 12. tedna nosečnosti so dokazali Johnson s

sodelavci in Kelly s sodelavci (96, 97, 98). Zato ženskam v rodni dobi, ki načrtujejo nosečnost, svetujejo jemanje folatnih pripravkov, 400 µg dnevno do 12. tedna nosečnosti. Little in sodelavci so v študiji populacije z visokim deležem NTD želeli preveriti vpliv folatov na pojavnost OFC. Rezultati študije niso pokazali signifikantnega vpliva folatnih pripravkov ali s folatom bogate hrane (98). Sklepamo, da imata genetska predispozicija in pozitivna družinska anemneza pomemben in v primerjavi z zaščitno vlogo folata večji vpliv na pojavnost malformacij. Znano je, da v času nosečnosti vitamini in minerali vplivajo na formacijo ploda. Vujkovic in sodelavci ugotavljajo pomemben vpliv prehrane na nosečnost in posledičnega vnosa folne kisline, vitaminov in mikroelementov. Ugotovili so signifikantni vpliv vzhodnega načina prehranjevanja (velik vnos mesa, pice, krompirja in nizek vnos sadja) na večjo pojavnost OFC (99). Hozyasz s sodelavci je dokazal vpliv zmanjšane serumske koncentracije cinka in povišane vrednosti serumskega bakra na patoetiologijo OFC (100). Zaključimo lahko, da folna kislina predstavlja pomemben dejavnik tveganja za razvoj obraznih malformacij, vendar ne smemo zanemariti kumulativnega učinka multivitaminov in mineralov v sklopu raznolike prehrane.

Statistično značilna razlika med zdravo in OFC nosečnostjo je bila prisotna pri jemanju **drugih zdravil med nosečnostjo** ($p = 0,029$). Delež mater, ki so jemale zdravila med nosečnostjo, je bil večji med OFC nosečnostjo. Vpliva **protiepileptične terapije na nastanek OFC** v naši študiji nismo dokazali. Najverjetneje vpliva jemanja protiepileptičnih zdravil v času nosečnosti nismo dokazali (kot nekatere druge študije) zaradi premajhnega števila sodelujočih in posledično premajhne statistične moči testiranja. V študijo je bila vključena le ena mati z uvedeno protiepileptično terapijo. Številne kemikalije, strupi, pesticidi, droge in zdravila so znani teratogeni dejavniki tveganja prirojenih nepravilnosti. Izpostavljenost različnim teratogenim snovem v času nosečnosti lahko pomembno vpliva na pojavitev OFC. Med teratogene dejavnike uvrščamo tudi nekatere protiepileptike, kortikosteroide in zdravila, vpletena v kronični bolečinski sindrom (diazepam, benzodiazepam) (65). Številne raziskave so preiskovale varnost uporabe protiepileptičnih zdravil in prišle do zaključkov, da določeni tradicionalni protiepileptiki delujejo teratogeno in vplivajo na razvoj malformacij ploda. Veroniki s sodelavci je z meta-analizo dokazala statistični vpliv fenobarbitala, fenotoina, valprota, pirimidona, topiromata in etosukcimida na pojavnost obraznih malformacij. Prav tako so v raziskavi želeli preveriti protiepileptična zdravila nove generacije (lamotrigin in levetiracetam) in dokazali varnost njihove uporabe med nosečnostjo (68).

Pričakovano statistično značilne razlike med zdravo in OFC nosečnostjo nismo opazili pri prisotnosti **drugih kroničnih obolenj matere**, saj je bila kronična bolezen v večini primerov prisotna v obeh nosečnostih.

Preglednica VIII: Prikaz števila in frekvenc izidov v posameznih kategorijah preučenih kategoričnih spremenljivk okoljskih dejavnikov tveganja za OFC ter prikaz rezultatov osnovne statistične analize.

** Za testiranje razlik odvisnih vzorcev, razvrščenih v dve kategoriji, smo uporabili odvisni McNemarjev test. Marginalni test homogenosti pa smo uporabili za testiranje odvisnih vzorcev, razvrščenih v več kot dve kategoriji. N = 122.** Pri spremenljivkah: tip folatnih pripravkov v prvem trimesečju in rednost jemanja folatnih pripravkov je N < 122 zaradi manjkajočih podatkov.*

Spremenljivka	Izid	Zdrava nosečnost n (%)	OFC nosečnost n (%)	p*
Spol otroka	Moški	58 (47,5)	70 (57,4)	0,156
	Ženska	64 (52,5)	52 (42,6)	
Prednosečniški diabetes	Ne	122 (100)	122 (100)	1
	Da	0 (0)	0 (0)	
Nosečniški diabetes	Ne	115 (94,3)	111 (91)	0,388
	Da	7 (5,7)	11 (9)	
Druga kronična bolezen matere	Ne	108 (88,5)	106 (86,9)	0,625
	Da	14 (11,5)	16 (13,1)	
Protiepileptična terapija v nosečnosti	Ne	121 (99,2)	121 (99,2)	1
	Da	1 (0,8)	1 (0,8)	
Druga zdravila med nosečnostjo	Ne	87 (71,3)	72 (59)	0,029
	Da	35 (28,7)	50 (41)	
Povišana telesna temperatura > 38 °C v prvem trimesečju	Ne	118 (96,7)	102 (83,6)	0,002
	Da	4 (3,3)	20 (16,4)	
Savna v prvem trimesečju	Ne	122 (100)	120 (98,4)	0,500
	Da	0 (0)	2 (1,6)	
Jemanje folatnih pripravkov pred zanositvijo	Ne	91 (74,6)	88 (72,1)	0,719
	Da	31 (25,4)	34 (27,9)	
Jemanje folatnih pripravkov v prvem trimesečju	Ne	50 (41,0)	47 (38,5)	0,629
	Da	72 (59,0)	75 (61,5)	
Tip folatnih pripravkov v prvem trimesečju**	Folna kislina	46 (100)	55 (100)	1
	Metafolin	0 (0)	0 (0)	
Začetek jemanja folatnih pripravkov v nosečnosti	Prej kot 3 tedne po zanositvi	57 (46,7)	55 (45,1)	0,710
	Kasneje kot 3 tedne po zanositvi	15 (12,3)	22 (18,0)	
	Brez folatnih pripravkov	50 (41,0)	45 (36,9)	
	Visoka	68 (94,4)	69 (89,6)	

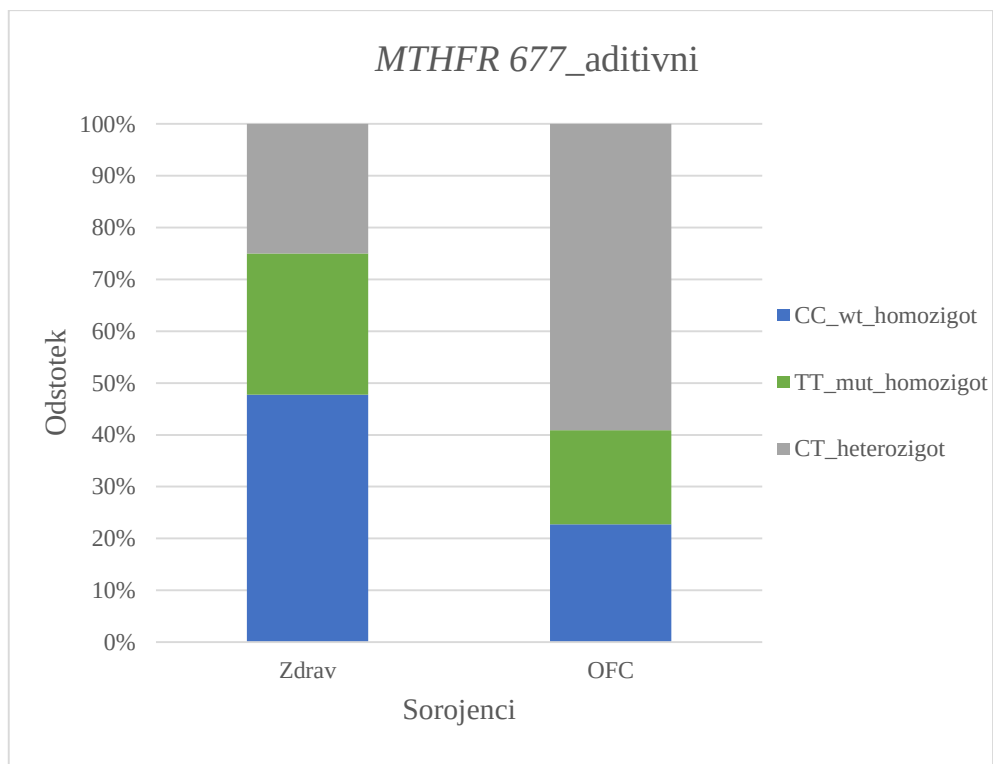
Spremenljivka	Izid	Zdrava nosečnost n (%)	OFC nosečnost n (%)	p*
Rednost jemanja folatnih pripravkov**	Zmerna	1 (1,4)	3 (3,9)	0,033
	Nizka	3 (4,2)	5 (6,5)	
Druga prehranska dopolnila med nosečnostjo	Ne	105 (86,1)	105 (86,1)	0,310
	Multivitamini	8 (6,6)	1 (0,8)	
	Minerali (Mg ²⁺ , Ca ²⁺)	7 (5,7)	7 (5,7)	
	Omega 3	1 (0,8)	5 (4,1)	
	Ostalo	1 (0,8)	4 (3,3)	

4.2.2 GENETSKI DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OFC

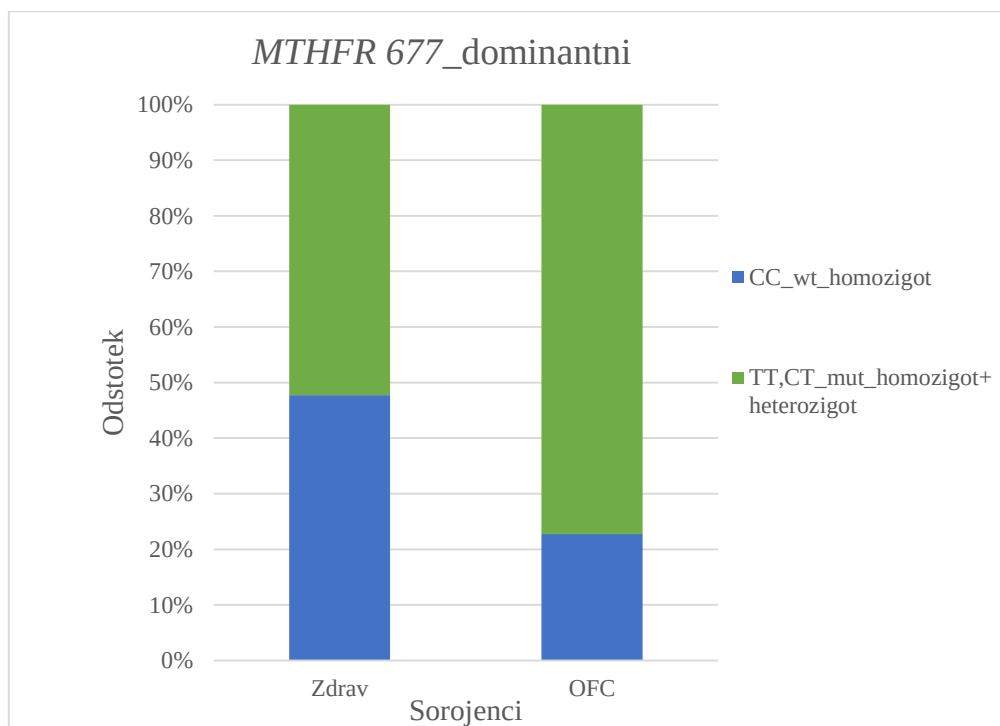
V prvi stopnji analize rezultatov genotipizacije desetih polimorfizmov v devetih genov, katerih produkti sodelujejo pri presnovi folatov, smo za vsakega izmed polimorfizmov naredili tri različne genetske modele izražanja alelov, ki bi lahko bili vpleteni v nastanek OFC, enako kot pri LCL.

Rezultati statistične analize kažejo, da je med sorojenci z in brez OFC prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za polimorfizem *MTHFR* 677 (rs1801133), *MTHFR* 1298 (rs1801131) in polimorfizem *GNMT* (rs10948059). Za polimorfizme v genih *MTRR* (rs1801394), *MTHFD1* (rs2236225), *BHMT* (rs3733890), *DNMT3B* (rs2424913), *FPGS* (rs1544105), *DHFR* (rs1677693) in *SLC19A1* (rs1051266) statistično značilne razlike v razporeditvi genotipov med skupinama nismo odkrili (Preglednica IX, Preglednica X, Preglednica XI).

Statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za polimorfizem *MTHFR* 677 (rs1801133) je bila ugotovljena za aditivni ($p = 0,002$) in dominantni ($p = 0,019$) model. Iz grafa (Slika 25) vidimo, da je odstotkovno večji delež nemutiranih homozigotov (CC) (47,7 %) in mutiranih homozigotov (TT) (27,3 %) prisoten pri zdravih sorojencih. Medtem ko je pri otrocih z OFC izidom prisoten večji delež heterozigotov (CT) (58,1 %), pri dominantnem modelu vidimo (Slika 26), da je delež nemutiranih homozigotov (CC) večji pri zdravih sorojencih, delež mutiranih homozigotov (TT) in heterozigotov (CT) pa je večji pri OFC otrocih. Sklepamo lahko, da imajo nemutirani homozigoti (CC) manjše tveganje za nastanek OFC, medtem ko prisotnost vsaj enega mutiranega alela (T) to tveganje poveča.

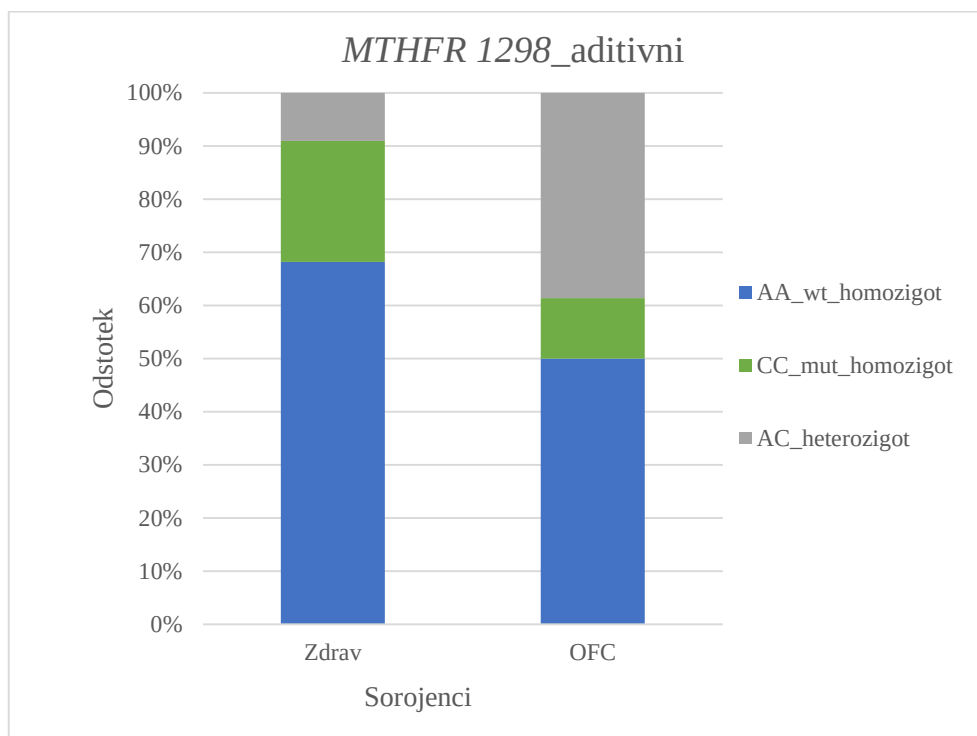


Slika 25: Stolpični diagram prikazuje razporeditev *MTHFR* 677 genotipa, aditivno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojencih.



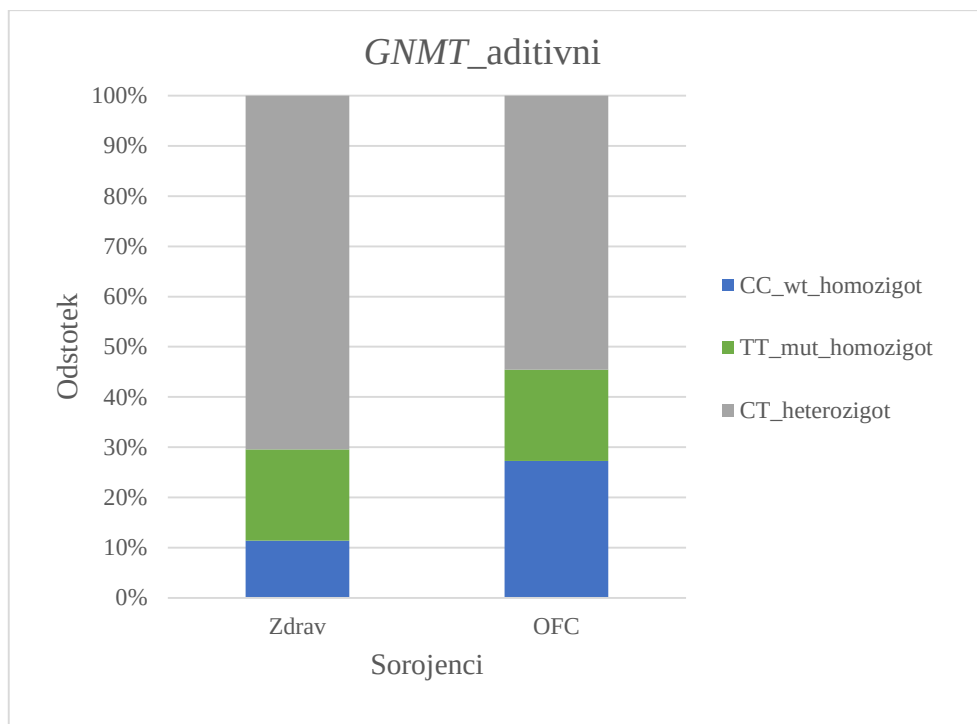
Slika 26: Stolpični diagram prikazuje razporeditev *MTHFR* 677 genotipa, dominantno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojencih

Prav tako je bila za polimorfizem *MTHFR* 1298 (rs1801131) ugotovljena statistična razlika v razporeditvi genotipov med zdravo in OFC skupino otrok za aditivni model izražanja alelov ($p = 0,005$). Iz grafa (Slika 27) vidimo, da je večji delež nemutiranih homozigotov (AA) (68,2 %) in mutiranih homozigotov (CC) (22,7 %) prisoten pri zdravih sorojencih, večji delež heterozigotov (AC) pa je prisoten pri otrocih z OFC (39,5 %).

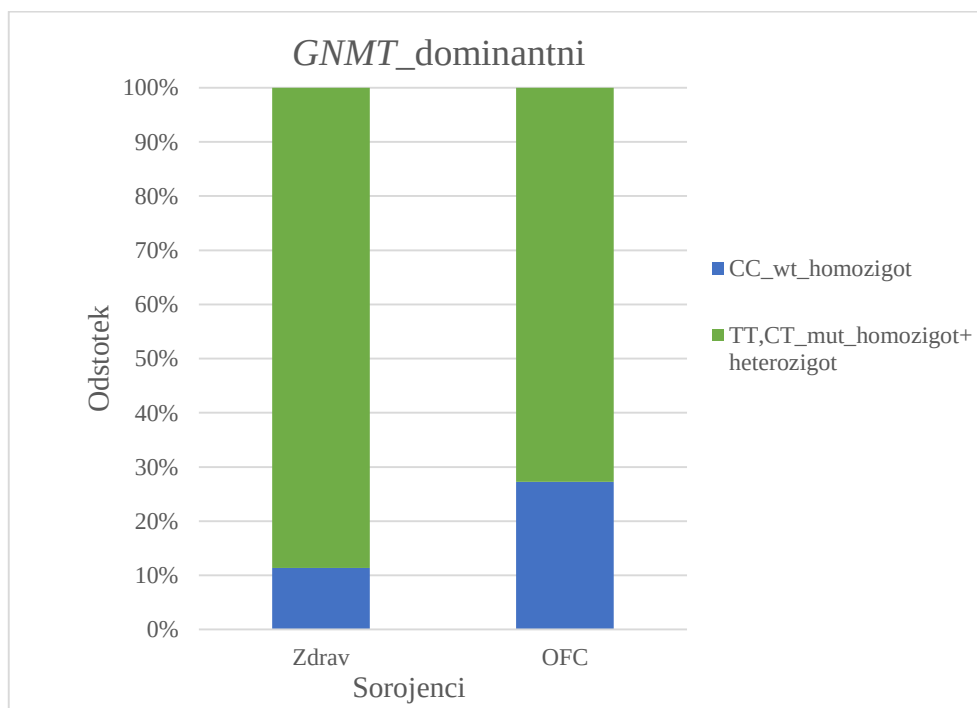


Slika 27: Stolpični diagram prikazuje razporeditev *MTHFR* 1298 genotipa, aditivno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojencih.

Do zanimivih rezultatov smo prišli pri analizi *GNMT* (rs10948059) polimorfizma, statistična razlika v razporeditvi genotipov med zdravo in OFC skupino otrok je bila prisotna pri aditivnem ($p = 0,002$) in dominantnem modelu ($p = 0,039$). Razporeditev je dobro razvidna iz grafa (Slika 28). Delež heterozigotov (CT) je večji v zdravi (70,5 %) kot OFC skupini otrok (53,5 %), medtem ko je delež nemutiranih homozigotov (CC) (27,9 %) večji pri OFC otrocih. Po deležu heterozigotov med skupinama bi lahko sklepali na protektivno vlogo heterozigota. Iz dominantnega modela porazdelitve (Slika 29) vidimo, da je delež nemutiranih homozigotov (CC) pri OFC otrocih (27,9 %) skoraj za dvakrat večji v primerjavi z zdravimi sorojenci (11,4 %), iz česar sklepamo, da prisotnost T alela zmanjša tveganje za nastanek OFC.



Slika 28: Stolpični diagram prikazuje razporeditev GNMT genotipa, aditivno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojencih.



Slika 29: Stolpični diagram prikazuje razporeditev GNMT genotipa, dominantno pri otrocih z OFC in njihovih zdravih sorojencih.

Preglednica IX: Prikaz števila in frekvenc genotipov za preučevane polimorfizme (aditivni model in MTHFR encimska aktivnost) ter rezultati osnovne statistične analize.

* Za testiranje razlik odvisnih vzorcev, razvrščenih v dve kategoriji (MTHFR encimska aktivnost), smo uporabili odvisni McNemarjev test. Za testiranje ostalih odvisnih vzorcev genov pa smo uporabili marginalni test homogenosti. MTHFR encimska aktivnost < 60 %: MTHFR 677 TT/ 1298 AA + MTHFR 677 CT/ 1298 AC. MTHFR encimska aktivnost > 60 %: vse ostale kombinacije, MTHFR 677 CC/ 1298 AA/AC/CC + MTHFR 677 CT/ 1298 AC. N = 44 parov sorojencev. ** Pri genotipizaciji zdravih sorojencev za gen SLC19A1 je zaradi neuspešne genotipizacije N = 43.

Gen	Genotip	Zdrav sorojenec n (%)	Otrok z OFC n (%)	p*
MTHFR rs1801133 C>T	CC	21 (47,7)	10 (22,7)	0,002
	TT	12 (27,3)	8 (18,2)	
	CT	11 (25,0)	26 (59,1)	
MTHFR rs1801131 A>C	AA	30 (68,2)	22 (50,0)	0,005
	CC	10 (22,7)	5 (11,4)	
	AC	4 (9,1)	17 (38,6)	
MTHFR encimska aktivnost	> 60 %	30 (68,2)	25 (56,8)	0,523
	< 60 %	14 (31,8)	19 (43,2)	
MTRR rs1801394 A>G	AA	8 (18,2)	10 (22,7)	0,668
	GG	14 (31,8)	14 (31,8)	
	AG	22 (50,0)	20 (45,5)	
MTHFD1 rs2236225 G>A	GG	15 (34,1)	10 (22,7)	0,145
	AA	15 (34,1)	14 (31,8)	
	GA	14 (31,8)	20 (45,5)	
BHMT rs3733890 G>A	GG	23 (52,3)	22 (50,0)	0,572
	AA	7 (15,9)	5 (11,4)	
	GA	14 (31,8)	17 (38,6)	
GNMT rs10948059 C>T	CC	5 (11,4)	12 (27,3)	0,035
	TT	8 (18,2)	8 (18,2)	
	CT	31 (70,5)	24 (54,5)	
DNMT3B rs2424913 C>T	CC	13 (29,5)	12 (27,3)	0,655
	TT	12 (27,3)	11 (25,0)	
	CT	19 (43,2)	21 (47,7)	
FPGS rs1544105 C>T	CC	12 (27,3)	18 (40,9)	0,285
	TT	12 (27,3)	8 (18,2)	
	CT	20 (45,5)	18 (40,9)	
DHFR rs1677693 C>A	CC	26 (59,1)	25 (56,8)	0,599
	AA	6 (13,6)	4 (9,1)	
	CA	12 (27,3)	15 (34,1)	
SLC19A1** rs1051266 G>A	GG	11 (25,6)	15 (34,1)	0,208
	AA	7 (16,3)	10 (22,7)	
	GA	25 (58,1)	19 (43,2)	

Preglednica X: Prikaz števila in frekvenc genotipov za preučevane polimorfizme (recesivni model).

** Za testiranje razlik odvisnih vzorcev smo uporabili odvisni McNemarjev test. N = 44 parov sorojencev. ** Pri genotipizaciji zdravih sorojencev za gen SLC19A1 je zaradi neuspešne genotipizacije N = 43.*

Gen	Genotip	Zdrav sorojenec n (%)	Otrok z OFC n (%)	p*
MTHFR rs1801133 C>T	CC, CT	32 (72,7)	36 (81,8)	0,454
	TT	12 (27,3)	8 (18,2)	
MTHFR rs1801131 A>C	AA, AC	34 (77,3)	39 (88,6)	0,227
	CC	10 (22,7)	5 (11,4)	
MTRR rs1801394 A>G	AA, AG	30 (68,2)	30 (68,2)	1,000
	GG	14 (31,8)	14 (31,8)	
MTHFD1 rs2236225 G>A	GG, GA	29 (65,9)	30 (68,2)	1,000
	AA	15 (34,1)	14 (31,8)	
BHMT rs3733890 G>A	GG, GA	37 (84,1)	39 (88,6)	0,500
	AA	7 (15,9)	5 (11,4)	
GNMT rs10948059 C>T	CC, CT	36 (81,8)	36 (81,8)	1,000
	TT	8 (18,2)	8 (18,2)	
DNMT3B rs2424913 C>T	CC, CT	32 (72,7)	33 (75,0)	1,000
	TT	12 (27,3)	11 (25,0)	
FPGS rs1544105 C>T	CC, CT	32 (72,7)	36 (81,8)	0,388
	TT	12 (27,3)	8 (18,2)	
DHFR rs1677693 C>A	CC, CA	38 (86,4)	40 (90,9)	0,688
	AA	6 (13,6)	4 (9,1)	
SLC19A1** rs1051266 G>A	GG, GA	36 (83,7)	27 (77,3)	0,453
	AA	7 (16,3)	17 (22,7)	

Preglednica XI: Prikaz števila in frekvenc genotipov za preučevane polimorfizme (dominantni model).

** Za testiranje razlik odvisnih vzorcev smo uporabili odvisni McNemarjev test. N = 44 parov sorojencev. ** Pri genotipizaciji zdravih sorojencev za gen SLC19A1 je zaradi neuspešne genotipizacije N = 43.*

Gen	Genotip	Zdrav sorojenec n (%)	Otrok z OFC n (%)	p*
MTHFR rs1801133 C>T	CC	21 (47,7)	10 (22,7)	0,019
	CT, TT	23 (52,3)	34 (77,3)	
MTHFR rs1801131 A>C	AA	30 (68,2)	22 (50,0)	0,077
	AC, CC	14 (31,8)	22 (50,0)	
MTRR rs1801394 A>G	AA	8 (18,2)	10 (22,7)	0,774
	AG, GG	36 (81,8)	34 (77,3)	
MTHFD1 rs2236225 G>A	GG	15 (34,1)	10 (22,7)	0,359
	GA, AA	29 (65,9)	34 (77,3)	
BHMT rs3733890 G>A	GG	23 (52,3)	22 (50,0)	1,000
	GA, AA	21 (47,7)	22 (50,0)	
GNMT rs10948059 C>T	CC	5 (11,4)	12 (27,3)	0,039
	CT, TT	39 (88,6)	32 (72,7)	
DNMT3B rs2424913 C>T	CC	13 (29,5)	12 (27,3)	1,000
	CT, TT	31 (70,5)	32 (72,7)	

FPGS	CC	12 (27,3)	18 (40,9)	0,180
rs1544105 C>T	CT, TT	32 (72,7)	26 (59,1)	
DHFR	CC	26 (59,1)	25 (56,8)	1,000
rs1677693 C>A	CA, AA	18 (40,9)	19 (43,2)	
SLC19A1**	GG	11 (25,6)	15 (34,1)	0,581
rs1051266 G>A	GA, AA	32 (74,4)	29 (65,9)	

Prisotnost polimorfizmov v ključnih genih folatnega cikla je pogosta. Z genotipizacijo 44 parov sorojencev (zdrav in z OFC) smo želeli indentificirati razporeditev izbranih polimorfizmov, na podlagi katere lahko sklepamo na povečano tveganje za nastanek neustreznih folatnih statusov in razvoj OFC. Vpliv genetskih dejavnikov ter vrste in koncentracije spojine (FA ali 5-Me-THF) smo z MTS testom preučili tudi v populaciji LCL.

MTHFR encim ima pglavlitno vlogo v presnovni poti folata. Je ključni encim za regulacijo remetilacije homocisteina in 5-metiltetrahidrofolata, ki je osnovna oblika folata v telesu. Gen *MTHFR* je zelo polimorfen, v slovenski populaciji ima polno aktivnost encima MTHFR le 9,3 % posameznikov. Zmanjšana encimska aktivnost je lahko posledica polimorfizmov gena *MTHFR*. Poznanih je več kot 40 polimorfizmov (11, 101). Predvideno normalno aktivnost MTHFR encima je imelo 13,6 % zdravih sorojencev in samo 2,2 % otrok z OFC. Sklepamo, da znižana encimska aktivnot MTHFR poveča verjetnost za nastanek OFC. V študiji slovenske populacije OFC otrok so dokazali, da se pojavnost shize poveča pri nosilcih genotipov *MTHFR*, ki kodirajo manj aktivne oblike encima MTHFR (11). Pri analizi relativne metabolne aktivnosti LCL smo izmerili signifikantno značilno večjo metabolno aktivnost pri genotipih *MTHFR* z < 60 % encimske aktivnosti (*MTHFR* 677 TT/ *MTHFR* 1298 AA + *MTHFR* 677 CT/ *MTHFR* 1298 AC), vendar pri dodatku nefiziološko visokih koncentracij FA ali 5-Me-THF. Iz tega bi lahko sklepali, da dodatek folatov celicam v stanju folatnega pomanjkanja bolj vpliva na metabolno aktivnost celic z nizko aktivnostjo MTHFR kot tistih z visoko aktivnostjo MTHFR. To je v skladu z ugotovitvijo, da jemanje folatnih pripravkov izniči vpliv *MTHFR* genotipa na nastanek malformacij ploda (npr. NTD) (101, 102). Vendar signifikantnega učinka materinega vnosa folne kisline med nosečnostjo na izničitve vpliva *MTHFR* genotipa za nastanek OFC v iranski študiji OFC otrok (N = 47) niso dokazali, kar je lahko posledica majhnosti vzorca (103). Za boljše razumevanje vpliva jemanja folatnih pripravkov med nosečnostjo na izničitve vpliva *MTHFR* genotipa je treba vpliv dodatno preučiti in preveriti na večjem vzorcu.

MTHFR c.677C>T (rs1801133) polimorfizem se nahaja v katalitični domeni encima, zamenjava citozina s timinom na mestu 677 vodi do termolabilnega encima z zmanjšano encimsko aktivnostjo. Pri heterozigotih je encimska aktivnost zmanjšana za 35 % glede na aktivnost pri osebah z normalnim genotipom, medtem ko morajo posamezniki z *MTHFR* 677 TT genotipom vnesti do 1,4-krat več folata, da imajo zaradi zmanjšane encimske aktivnosti primerljive serumske koncentracije folata s posamezniki z genotipom divjega tipa (9, 104). Kombinacija zmanjšane encimske aktivnosti *MTHFR* s pomanjkljivim vnosom folata predstavlja tveganje za kopičenje homocisteina. Prevalenca *MTHFR* 677 TT genotipa se v svetovni populaciji giblje med 10 in 30 %, le Afričani imajo prevalenco do 3 %. V slovenski populaciji je polimorfizem *MTHFR* 677 prisoten pri več kot polovici prebivalstva, 12 % je mutiranih homozigotov (TT), 42 % nemutiranih homozigotov (CC) in 46 % heterozigotov (CT) (104). Razporeditev genotipov v naši študiji pri zdravih otrocih nekoliko odstopa od slovenske populacije, najverjetneje je vzrok v majhnosti (N = 44) in sestavi vzorca (prisotna družinska anamneza za OFC). Pozitivno povezavo zmanjšane encimske aktivnosti *MTHFR* ob prisotnosti mutiranega alela T (*MTHFR* 677) so v številnih študijah dokazali kot dejavnik tveganja za razvoj OFC (105, 106, 107). Medtem ko so v francoski študiji otrok z OFC dokazali, da mutirani genotip TT polimorfizma *MTHFR* c.677C>T v povezavi z materinim vnosom folatov med nosečnostjo ni dejavnik tveganja za OFC (108). To se nanaša na zgoraj omenjeno ugotovitev, da jemanje folatnih pripravkov izniči vpliv *MTHFR* genotipa na nastanek malformacij ploda. Tudi Jugessur s sodelavci je dokazal zaščitno vlogo mutiranega alela T, vendar je bila zaščitna vloga višja, kadar matere v nosečnosti niso jemale folatnih pripravkov (109). Estandia-Ortega s sodelavci je v študiji mehiške populacije otrok z OFC prišel do podobnih ugotovitev (108). Pri analizi relativne metabolne aktivnosti LCL smo izmerili signifikantno značilno večjo metabolno aktivnost pri genotipih *MTHFR* 677 za mutirani homozigotni genotip (TT) v primerjavi s heterozigotnim (CT) in nemutiranim homozigotnim (CC) genotipom, vendar pri dodatku nefiziološko visokih koncentracij FA ali 5-Me-THF. Sklepamo, da dodatek folatov celicam, ki nimajo minimalnega dodatka folatov, bolj vpliva na metabolno aktivnost celic z nizko aktivnostjo *MTHFR* kot tistih z visoko aktivnostjo *MTHFR*. Luo Y s sodelavci je v meta-analizi 18 študij dokazal pozitivno povezavo med materinim mutiranim homozigotnim genotipom (TT) *MTHFR* c.677C>T in nastankom OFC pri otroku (111). Pomembnost materinega genotipa *MTHFR* 677 za razvoj OFC bi bilo treba še dodatno preučiti. Smiselno

bi bilo, da bi v našo študijo vključili tudi genotipe matere za izbrane polimorfizme folatnega cikla.

Drugi najpogostejši polimorfizem v *MTHFR* genu je zamenjava adenzina s citozinom na mestu 1298 (rs1801131). Aktivnost je pri mutiranem homozigotnem genotipu *MTHFR* 1298 (CC) zmanjšana za 40 % v primerjavi z normalno encimsko aktivnostjo. V slovenski populaciji je *MTHFR* 1298 mutiranih homozigotov (CC) 10 %, heterozigotov (AC) 42 % in nemutiranih homozigotov (AA) 47 % (104). V naši študiji je pri zdravih sorojcih delež nemutiranih in mutiranih homozigotov večji. Razlogi so podobni kot pri *MTHFR* c.677C>T. Pri analizi *MTHFR* c.1298A>C genotipov Estandio-Ortega s sodelavci med skupinama zdravih in posameznikov z OFC ni dokazal signifikantnih razlik med zastopanostjo mutiranega alela C v primerjavi z divjim tipom A (110). V meta-analizi 17 študij je Pan s sodelavci pri *MTHFR* c.1298A>C dokazal zaščitno vlogo mutiranega alela C pri razvoju OFC (105), kar je ugotovil tudi Pezzeti s sodelavci (106). Na podlagi SPSS analize relativne metabolne aktivnosti LCL lahko zaključimo, da na metabolno aktivnost statistično značilno vpliva genotip *MTHFR* (677 in 1298), klasificiran glede na aktivnost encima *MTHFR* in genotip *MTHFR* 677 ter koncentracija FA oziroma 5-Me-THF, medtem ko imata obe obliki folatov podoben učinek na metabolno aktivnost.

Encim metionin sintaza reduktaza **MTRR** je odgovoren za ohranjanje encima metionin sintaze (MTR) v aktivni obliki preko regeneracije kofaktorja metionin sintaze, metilkobalamina (110). Frekvenca polimorfizma gena *MTRR* c.66A>G (rs1801394) znaša v svetovni populaciji okoli 30 %, medtem ko pri beli rasi znaša približno 50 % (112, 113). Razporeditev alelov *MTRR* se v naši študiji med zdravo in OFC skupino ni razlikovala. Zhu s sodelavci in Willson s sodelavci poročata, da mutiran alel (G) predstavlja dejavnik tveganja za nastanek NTD (113, 114). Willson s sodelavci je ugotovil povezavo med prisotnostjo mutiranega alela (G) in nizko koncentracijo kobalamina z večjim tveganjem za prirojene kongenitalne motnje (103). Pri analizi LCL celic smo izmerili največjo metabolno aktivnost pri mutiranem homozigotnem genotipu (GG), sledila sta nemutirani homozigotni (AA) in heterozigotni genotip (AG), kar se sklada z zaščitno vlogo alela G pri razvoju NTD, ki jo je dokazal Relton s sodelavci (115). Signifikantno značilen je bil vpliv genotipa in koncentracije spojine na metabolno aktivnost. Potrebne so dodatne študije *MTRR* gena, ki bi preiskovale vpliv posameznega alela na pojavnost OFC, saj so po večini študije osredotočene na NTD.

MTHFD1 je pomemben encim med embrionalnim razvojem, katalizira nastanek različnih oblik tetrahidrofolatov, ki sodelujejo pri sintezi dTMP iz purinov za nemoteno DNA replikacijo. Polimorfizem gena *MTHFD1* c.1958G>A (rs2236225) povzroči destabilizacijo encima in zmanjšano encimsko aktivnost (114). V študiji nismo dokazali signifikantnega vpliva gena *MTHFD1* na pojavnost OFC. V *in vitro* LCL modelu smo opazili večjo metabolno aktivnost LCL z mutiranim genotipom (AA). Ker pa nemutiran genotip (GG) ni bil zastopan v naši študiji, bi morali vpliv G alela dodatno preučiti. O neustreznosti gena *MTHFD1* kot biomarker za napoved OFC poroča Nascimento de Aquino s sodelavci, ki niso dokazali razlik v razporeditvi *MTHFD1* genotipov v brazilski populaciji (116). Prav tako na podlagi meta-analize osmih študij Zhao s sodelavci ne poroča o razlikah v razporeditvi *MTHFD1* genotipov (117).

Gen **BHMT** kodira od cinka odvisen encim betain homocistein metiltransferazo, ki katalizira prenos metilne skupine iz betaina na homocistein in nastanek metionina in dimetilglicina. Moteno delovanje encima je povezano s teratogenimi učinki nakopičenega homocisteina in omejenimi metilacijskimi reakcijami. Polimorfizem gena *BHMT* c.742G>A (rs3733890) je pogosta točkovna mutacija na 742. nukleotidnem mestu gena, ki predstavlja tveganje za nastanek NTD in OFC (24, 25). Pri preučevanju LCL je nemutirani homozigotni genotip (GG) imel višjo metabolno aktivnost po dodatku folatov kot heterozigotni genotip (GA). Med LCL nismo imeli zastopanega mutiranega homozigotnega genotipa (AA), zato bi bilo treba eksperiment preoblikovati in vnovič testirati. Razporeditev genotipov med skupinama zdravih in OFC otrok je za posamezne alele zelo podobna. Zhu s sodelavci ni našel signifikantne povezave med polimorfizmom in tveganjem za nastanek OFC, poročajo o blagem povečanju tveganja pri homozigotih za alel A (118). Zaščitne vloge posameznega alela v populaciji OFC in zdravih sorojencev nismo mogli dokazati, čeprav Štruc poroča, da ima G alel zaščitni učinek na razvoj OFC (119). Uspeli pa smo dokazati boljši odziv na folate pri LCL z nemutiranim homozigotnim genotipom (GG). Za boljše razumevanje izražanja polimorfizma ter vpliv na razvoj OFC so potrebne nadaljnje raziskave. Smiselno bi bilo genotipizirati mame otrok z OFC, saj se *BHMT* izraža v času kronofacialnega razvoja in ima lahko na sam razvoj večji vpliv materin genotip.

Glicin-N-metiltransferaza (**GNMT**) je encim, ki preko regulacije koncentracije SAH in razmerja SAM:SAH vpliva na presnovo homocisteina. Polimorfizmi v genu *GNMT* vplivajo na aktivnost transkripcije in preko povišanih koncentracij homocisteina na nastanek

razvojnih napak ploda. Na podlagi študije na naši fakulteti sklepamo, da obstaja povezava med mutiranim alelom T genotipa *GNMT* c.-45C>T (rs10948059) in pojavnostjo OFC. Tina Štruc je dokazala večjo pojavnost OFC pri posameznikih z mutiranim homozigotnim genotipom (TT) (119). Beagle in sodelavci so ugotovili, da mutiran genotip *GNMT* (TT) preko mehanizma povečane aktivnosti GNMT vpliva na koncentracijo homocisteina. Poročajo, da se koncentracija homocisteina pri omejevanju vnosa folata zviša samo pri ženskah z mutiranim genotipom gena *GNMT* (TT) (120). Nasprotno pa smo v naši študiji zdravih in OFC sorojencev ugotovili, da T alel zmanjša tveganje za nastanek OFC. Možno zaščitno vlogo T alela gena *GNMT* za nastanek OFC je treba še dodatno preučiti. Pri preučevanju metabolne aktivnosti LCL smo izmerili statistično značilen vpliv genotipa *GNMT* na metabolno aktivnost in dobili rezultate, ki so v skladu s prej omenjenimi raziskavami, ki povezujejo alel T s povečano encimsko aktivnostjo. Najvišjo metabolno aktivnost smo zmerili pri nosilcih nemutiranega alela (CC), sledil je heterozigotni genotip (CT) in mutirani homozigotni genotip (TT), kar bi lahko odražalo nižjo koncentracijo homocisteina zaradi nižje encimske aktivnosti pri celicah z nemutiranim homozigotnim genotipom (CC). Zaradi dobljenih rezultatov, majhnosti vzorca in majhnega števila raziskav, ki so preučevale vpliv *GNMT* gena na pojavnost OFC, je treba vpliv gena *GNMT* na pojavnost OFC še dodatno preučiti.

Gen ***DNMT3B*** kodira encim, ki je odgovoren za *de novo* metilacijo DNA molekul, DNA (citozin-5-)-metiltransferazo-3 β (*DNMT3B*). Polimorfizem gena *DNMT3B* c.343-49C>T (rs2424913), ki se nahaja v intronu gena, skoraj verjetno poveča izražanje gena *DNMT3B* (28). Pri analizi metabolne aktivnosti LCL celic smo izmerili najvišje vrednosti pri heterozigotnem genotipu *DNMT3B* (CT), sledil je mutiran homozigotni genotip (TT) in z najnižjo vrednostjo metabolne aktivnosti nemutiran homozigotni genotip (CC). Mutacije v genu *DNMT3B* so razen z rakom (121) povezane tudi z NTD (122, 123). Študij, ki bi preučevale vpliv polimorfizma gena *DNMT3B* c.343-49C>T (rs2424913) na pojavnost OFC pri zarodku, nismo zasledili. Juriloff s sodelavci je ugotovil, da zmanjšana aktivnost *DNMT3B* predstavlja dejavnik tveganja za razvoj NTD (122), kar je v skladu z ameriško študijo, kjer so dokazali, da mišji zarodki z izbitim *DNMT3B* genotipom razvijejo NTD (124).

FPGS gen kodira encim folipoliglutamat sintetazo (*FPGS*), ki je preko poliglutamacije v celico vstopajočega folata pomemben za vzdrževanje homeostaze folata. Na ta način poveča

zadrževanje folata znotraj celic in afiniteto folata do encimov v nadaljnji presnovni poti. Predpostavili smo, da bi polimorfizem v intronski regiji gena *FPGS* c.217-3839C>T (rs1544105) vplival na poliglutamacijo in posledično na homeostazo folata in proliferacijo celic in s tem na razvoj OFC. Mutirana alelska različica (TT) je v literaturi povezana z manjšo količino prepisa gena *FPGS* (30, 31). V naši raziskavi smo dokazali signifikanten vpliv *FPGS* genotipov na metabolno aktivnost, vendar smo kljub poročani zmanjšani ekspresiji pri mutiranem homozigotnem genotipu (TT) izmerili višjo metabolno aktivnost celic v primerjavi s heterozigotomnim genotipom (CT) in nemutiranim homozigotnim genotipom (CC). Med zdravimi in OFC sorojenci ni bilo razlik v razporeditvi genotipov *FPGS*. Za nemutirano različico (CC) Tovek s sodelavci poroča o do 1,5-krat večji količini mRNA prepisa gena, vendar smo pri tej alelski različici izmerili najnižje vrednosti metabolne aktivnosti (31). Sklepamo lahko, da se celice z manjšo aktivnostjo *FPGS* po folatnem stradanju bolje odzovejo na dodatek folatov kot celice, ki imajo normalno aktivnost *FPGS*. To bi lahko razložili z dejstvom, da dodatek folatov ne more bistveno izboljšati metabolne aktivnosti celic z optimalno delujočim folatnim ciklom. Vendar pa dodatek večje količine folatov celici z defektom v folatnem ciklu lahko to napako omili.

DHFR gen kodira dihidrofolat reduktazo, ki je eden ključnih encimov folatnega cikla, saj pretvori DHF do biološko aktivne oblike THF. *DHFR* poleg DHF in njegovih poliglutamiranih derivatov katalizira dvostopensko redukcijo oksidirane folne kisline do THF (3, 34, 35). Vpliv polimorfizma gena *DHFR* c.253-2490C>A (rs1677693) na izražanje encima *DHFR* še ni dobro znan, vendar smo predvideli, da preko vzdrževanja biološko aktivne oblike folata v celicah vpliva na njegovo pomanjkanje in posledični razvoj OFC. Pri preučevanju relativne metabolne aktivnosti LCL smo ugotovili, da genotip *DHFR* in koncentracija spojine vplivata na metabolno aktivnost celic, prav tako je prisotna interakcija med genotipom in koncentracijo spojine. Najvišjo metabolno aktivnost smo sicer izmerili pri heterozigotnem genotipu *DHFR* (CA), vendar v izboru LCL nismo imeli zastopane linije z mutiranim homozigotnim genotipom *DHFR* (AA). Med zdravimi in OFC sorojenci ni bilo razlik v pogostosti *DHFR* genotipov. Smiselno bi bilo oblikovati študijo z zastopanim mutiranim homozigotnim genotipom (AA), v katerem bi preučili vpliv polimorfizma *DHFR* c.253-2490C>A (rs1677693) na ekspresijo in aktivnost encima *DHFR*, saj Martinelli s sodelavci poroča o zaščitni vlogi mutiranega alela A za razvoj CL/P (36). Jurka Klun zaščitne vloge mutiranega alela A ni odkrila. Poroča o 3-krat večjem tveganju za nastanek

OFC ob prisotnosti genotipa AA za polimorfizem *DHFR* (rs1677693, c.253-2490C>A) pri materi ali otroku (125).

Poglavitno vlogo transporta folatov iz sistemske cirkulacije v celice in tkiva opravlja prenašalni protein **SLC19A1** in je pomemben za transport v hrani prisotnih reduciranih oblik folatov. Do točkovne spremembe pride v kodonu za transmembranske domene in vpliva na samo transportno aktivnost prenašalnega proteina SLC19A1, kar pa vpliva na koncentracijo plazemskega folata (40). Na podlagi izsledkov različnih študij smo domnevali, da *SLC19A1* c.80G>A (rs1051266) preko vzdrževanja ustrezne koncentracije folatov v celici vpliva na razvoj OFC. Signifikantnih razlik v razporeditvi genotipov med zdravimi in OFC sorojenci nismo odkrili. Koncentracija spojine ima signifikantni vpliv na metabolno aktivnost celic, metabolna aktivnost je najvišja pri nemutiranem homozigotnem genotipu (GG). Chango s sodelavci poroča, da imajo nosilci nemutiranih alelov gena za prenašalni protein SLC19A1 (GG) višje plazemske koncentracije folata v primerjavi z nosilci mutiranih alelov (AA) (126). Medtem ko Stanislawska-Sachadyn s sodelavci o tem ne poroča (39). Pri kavkazijski populaciji je nemutiran homozigotni genotip (GG) prisotnen v 29 %, heterozigotni (GA) v 47,3 % in mutirani homozigotni (AA) v 23,7 % (40), v okvir katerih spadajo porazdelitve genotipa *SLC19A1* v zdravi in OFC skupini sorojencev. Kumari s sodelavci je dokazal vpliv nemutiranega alela (G) *SLC19A1* rs1051266 za nastanek OFC (127) in prav tako Vieira s sodelavci (128), medtem ko druge študije tega niso dokazale (129, 130).

5. SKLEPI

V magistrski nalogi smo želeli opredeliti vpliv genetskih polimorfizmov izbranih genov folatnega cikla, demografskih in okoljskih dejavnikov na ravni preskrbe organizma s folno kislino na pojavnost OFC. Vpliv omenjenih genetskih dejavnikov smo želeli preučiti na limfoblastoidnih celičnih linijah (LCL) in v populaciji sorojencev (zdravih in z OFC).

Pri preučevanju genetskih, demografskih in okoljskih dejavnikov smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Na metabolno aktivnost celic limfoblastoidne celične linije (LCL), ki so gojene v mediju brez folne kisline (L0503), vpliva: koncentracija spojine, genotip *MTHFR* klasificiran glede na encimsko aktivnost encima, genotip *MTHFR* c.677C>T (rs1801133), genotip *MTRR* c.66A>G (rs1801394), genotip *GNMT* c.-45C>T (rs1094059), genotip *DNMT3B* c.343-49C>T (rs2424913), genotip *DHFR* c.253-2490C>A (rs1677693) in genotip *SLC19A1* c.80G>A (rs1051266).
- Signifikantno značilna interakcija med genotipom limfoblastoidne celične linije (LCL) in koncentracijo spojine je bila prisotna za naslednje genotipe: *MTHFR* klasificiran glede na encimsko aktivnost encima, *GNMT* c.-45C>T (rs1094059), *DNMT3B* c.343-49C>T (rs2424913), *DHFR* c.253-2490C>A (rs1677693) in *SLC19A1* c.80G>A (rs1051266).
- Statistično značilna razlika v razporeditvi polimorfizmov *MTHFR* c.677C>T (rs1801133), *MTHFR* c.1298A>C (rs1801131) in *GNMT* c.-45C>T (rs10948059) je prisotna med sorojenci z in brez OFC:
 - pri polimorfizmu *MTHFR* c.677C>T (rs1801133) mutiran homozigotni genotip (TT) poveča tveganje za nastanek OFC;
 - pri polimorfizmu *MTHFR* c.1298A>C (rs1801131) prisotnost mutiranega alela C poveča tveganje za nastanek OFC;
 - pri polimorfizmu *GNMT* c.-45C>T (rs10948059) prisotnost mutiranega alela T zmanjša tveganje za nastanek OFC.
- Starost matere ob zanositvi je statistično značilno višja pri nosečnosti, v kateri se je rodil otrok z OFC.
- Manjše tveganje za razvoj OFC imajo prvorojenci.

- Povišana telesna temperatura ($> 38^{\circ}\text{C}$) v prvem trimesečju nosečnosti predstavlja dejavnik tveganja za razvoj OFC. Matere z OFC izidom nosečnosti o povišani telesni temperaturi ($> 38^{\circ}\text{C}$) poročajo do 5-krat pogosteje v primerjavi z materami z normalnim izidom nosečnosti.
- Rednost jemanja folatnih pripravkov pred in v nosečnosti zmanjša tveganje za rojstvo otroka z OFC.
- Uživanje zdravil med nosečnostjo predstavlja dejavnik tveganja za rojstvo otroka z OFC.

6. LITERATURA IN VIRI

1. Hoffbrand AV, Weir DG: The history of folic acid. Historical Review. *Br J Haematol* 2001; 113(3), 579–589.
2. Brody T, Shane B: Folic acid, Chapter 12 in *Handbook of Vitamins*, Third Edition. (Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB and Macklin LJ, eds.), Marcel Dekker, New York, 2001: 427–462.
3. Meeks HD: Nutrition and Genes Associated With Orofacial Cleft Birth Defects in Utah. Utah State University, All Graduate Theses and Dissertations, Utah, 2014.
4. Božović IB, Vraneković J: Folati i folna kiselina: dosadašnje spoznaje. *Kratki pregledni članek, medicina fluminensis* 2014; 50(2): 169–175.
5. Liu J, Ward RL: Folate and One-Carbon Metabolism and Its Impact on Aberrant DNA Methylation in Cancer. *Adv in Genet* 2010; 71.
6. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations*. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, 2013.
7. Saini RK, Nile SH, Keum YS: Folate: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. Review. *Food Res Inter*; 2016.
8. Combs GF: *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Third Edition, Elsevier Academic Press, New York, 2008: Chapter 16; 356–379.
9. Hiraoka M, Kagawa Y: Genetic polymorphisms and folate status. Review. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2017.
10. Nazki FH, Sameer SA, Ganale AB: Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene review* 2014; 533: 11–20.
11. Vidmar M, Geržej J, Geršak K, Mlinarič-Raščan I: Spremenjena aktivnost encima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) kot dejavnik tveganja za številne bolezni. *Zdrav Vestn* 2016; 85: 324–37.

12. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB: Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. Review. *Adv Nutr* 2012; 3: 21–38.
13. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288(16): 2015–22.
14. Bottiglieri T: Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29(7):1103–12.
15. Wehby G, Murray JC: Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral Dis* 2010; 16(1): 11–19.
16. Phan M, Conte F, Khandewal KD, Ockeloen C W, et al.: Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arm? *Hum Genet* 2016; 135: 1299–1327.
17. Goyette P, Pai A, Milos R, et al.: Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate. *Mamm Genome* 1998; 9: 652–656.
18. Boughrara W, Aberkane M, et al.: Impact of MTHFR rs1801133, MTHFR rs1801131 and ABCB1 rs1045642 polymorphisms with increased susceptibility of rheumatoid arthritis in the West Algerian population: a case-control study. *Artigo original, ACTA REUMATOL PORT* 2015; 40: 363–371.
19. Wang P, Li S, Wang M, He J, Xi S: Association of MTRR A66G polymorphism with cancer susceptibility: Evidence from 85 studies. *J Cancer* 2017; 8(2): 266–277.
20. Vandana R, Upendra Y, Pradeep K: MTRR A66G polymorphism among two caste groups of Uttar Pradesh (India). *Indian J Med Sci* 2012; 66(5,6): 136–140.
21. Christensen KE, Deng L, et al.: MTHFD1 Formyltetrahydrofolate Synthetase Deficiency, a Model for the MTHFD1 R653Q Variant, Leads to Congenital Heart Defects in Mice. *Birth Defect Res (Part A)* 2015; 103: 1031–1038.
22. Murthy J, Gurramkonda VB, Lakkakula BA: Significant association of MTHFD1 1958G>A single nucleotide polymorphism with nonsyndromic cleft lip and palate in Indian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19(6): e616–21.
23. Snieszawska A, Dorszewska J, et al.: MTHFR, MTR, and MTHFD1 gene polymorphisms compared to homocysteine and asymmetric dimethylarginine concentrations and their

metabolites in epileptic patients treated with antiepileptic drugs. *Seizure*, British Epilepsy Association, Published by Elsevier Ltd 2011; 533–540.

24. Colomina JM, Cavallé-Busquets P, et al.: Maternal Folate Status and the BHMT C716G>A Polymorphism Affect the Betaine Dimethylglycine Pathway during Pregnancy. *Nutrients* 2016; 8: 621.

25. Ganz AB, Cohen VV, Swersky CC, et al.: Genetic Variation in Choline-Metabolizing Enzymes Alters Choline Metabolism in Young Women Consuming Choline Intakes Meeting Current Recommendations. *Int J Mol Sci* 2017; 18(2): 252.

26. Ottaviani S, Brooke GN, Brown CO, et al.: Characterisation of the androgen regulation of glycine N-methyltransferase in prostate cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2013; 51(3): 301–312.

27. Huang YC, Lee CM, Chen M, et al.: Haplotypes, Loss of Heterozygosity, and Expression Levels of Glycine N-Methyltransferase in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(5): 1412–20.

28. Gacem RB, Abdelkrim OB, Ziadi S, Trimeche M: DNMT3B (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2012. Dostop: 21. 4. 2017: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/DNMT3BID40350ch20q11.html>.

29. Ehrlich M, Sanchez C, Shao C, et al.: ICF, an immunodeficiency syndrome: DNA methyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation. *Autoimmunity* 2008; 41(4): 253–71.

30. Piwkhram D, Siriboonpiputtana T, Beuten J, et al.: Mutation Screening and Association Study of the Folylpolyglutamate Synthetase (FPGS) Gene with Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16 (11): 4727–4732.

31. Leil TA, Endo C, Adjei AA, et al.: Identification and Characterization of Genetic Variation in the Folylpolyglutamate Synthase Gene. *Cancer Res* 2007; 67: (18).

32. Liu SG, Gao C, et al.: FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Inter* 2013; 13:107.

33. Huang Z, Tong HF, et al.: Association of folypolyglutamate synthetase (FPGS) gene polymorphism with blood drug concentration as well as adverse reactions of methotrexate in children with acute leukaemia. *Biomed Res* 2017; 28 (1): 478–483.
34. Levine AJ, Figueiredo JC, et al.: A Candidate Gene Study of Folate-Associated One Carbon Metabolism Genes and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(7): 1812–1821.
35. Krajcinovic M, Abaji R, Askari BS: DHFR (dihydrofolate reductase). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2015. Dostop: 1. 5. 2017: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_DHFR.html.
36. Martinelli M, Girardi A, Cura F, et al.: Evidence of the involvement of the DHFR gene in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Med Genet* 2014; 57(1): 1–4.
37. Etheredge AJ, Finnell RH, Carmichael SL, et al.: Maternal and infant gene-folate interactions and the risk of neural tube defects. *Am J Med Genet A* 2012; 158A(10): 2439–46.
38. Zhu H, Yang W, Lu W, et al.: Gene variants in the folate-mediated one-carbon metabolism (FOCM) pathway as risk factors for conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A*, 2012; 158A(5): 1124–34.
39. Stanislawska-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, Buckley PT, et al.: The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 484–491.
40. Zhao R, Goldman ID: Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Mol Aspects Med* 2013; 34(0).
41. Yee SW, Gong L, Badagnani I, et al.: SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20(11): 708–715.
42. Panamonta V, Pradubwong S, Panamonta M, Chowchuen B: Global Birth Prevalence of Orofacial Clefts: A Systematic Review. *Med Assoc Thai* 2015; 98 Suppl 7: S11–21.
43. Czeizel AE, Timar L, Sárközi A: Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 1999; 104(6): e66.

44. Matek I, Koželj V: Pojavnost zgornjega stranskega stalnega sekalca pri otrocih z orofacialnimi shizami. *Zobozdrav Vest* 2005; 60: 295–303.
45. Moxham BJ: The development of the palate – a brief review. *Eur J Anat*, 2003, 1: 53–74.
46. Watkins SE, Meyer RE, Strauss PR, et al.: Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clin Plast Surg* 2014; 41(2):149–63.
47. Eppley BL, A. von Aalst J, Robey A, Havlik RJ, Sadove M: The Spectrum of Orofacial Clefting. *Plast Reconstr Surg* 2005; vol 115(7), 101e–114e.
48. Tolarova MM: Pediatric Cleft Lip and Palate. *Medscape, Drugs & Diseases, Pediatrics: Surgery* 2016.
49. Van der Meulen F, Mazzola R, Stricker M, Raphael B: Classification of craniofacial malformations. *Plast Reconstr Surg* 1983; vol 71(4): 560–72.
50. Venkatesh R: Syndromes and anomalies associated with cleft. *Indian J Plast Surg* 2009; 42, Suppl S1:51–5.
51. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC: Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 167–178.
52. Ruff RR, Sischo L, Broder HL: Minimally important difference of the Child Oral Health Impact Profile for children with orofacial anomalies. *Health and Quality of Life Outcomes, BioMed Central* 2016; 14: 140.
53. Kummer AW: Cleft palate and craniofacial anomalies. Effects on speech and resonance. Third edition. Cengage learning, Delmar, 2014.
54. Sharma RK, Nanda V: Problems of middle ear and hearing in cleft children. *Indian J Plastic Surg (IJPS)* 2009; 42 (Suppl): S144–S148.
55. Nagarajan R, Savitha VH, Subramanian B: Communication disorders in individuals with cleft lip and palate: An overview. *Indian J Plastic Surg (IJPS)* 2009; 42(Suppl): S137–S143.

56. Avantaggiato A, Cura F, Girardi A, Lauritano D: Role of environmental factors in onset of non-syndromic orofacial cleft in Italian population. Review. *Annals of Oral & Maxillofacial Surg* 2014; 2(1): 3.
57. Mossey PA, Little J: Chapter 12: Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and palate. From origin to treatment*. Oxford University Press, 2002: 127–58.
58. Yong J, Carmichael CL, Canfield M, et al.: Socioeconomic Status in Relation to Selected Birth Defects in a Large Multicentered US Case-Control Study. *Am J Epidemiol* 2008; 167:145–154.
59. Bille C, Skytthe A, Vach W, et al.: Parent's Age and the Risk of Oral Clefts. *Epidemiol* 2005; 16(3): 311–316.
60. Chen BY, Hwang BF, Guo YL: Epidemiology of Congenital Anomalies in a Population-based Birth Registry in Taiwan, 2002. *J Formos Med Assoc* 2009; 108(6): 460–468.
61. Viera AR, Orioli IM, Murray JC: Maternal age and orol clefts: A reappraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 530–535.
62. Genisca AE, Firas JL, Broussard CS, et al.: Orofacial Clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. *Am J Med Genet Part A* 2009; 149A:1149–1158.
63. Abramowicz S, Cooper ME, Bardi K, et al.: Demographic and prenatal factors of patients with cleft lip and cleft palate. A pilot study. *JADA* 2003; Vol. 134.
64. Gil-da-Silva-Lopes VL, Monlleó IL: Risk factors and the prevention of oral clefts. *Braz Oral Res*, Sao Paulo, 2013.
65. Nilsson S, Merlo J, Ahlander VL, Psouni E: Psychotropic drug use in adolescents born with an orofacial cleft: a population-based study. *BMJ Open* 2015; 5: e005306.
66. Jugessur A, Murray JC: Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(3): 270–278.
67. Spilson SV, Kim HJE, Chung KC: “Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft,” *Annals of Plastic Surg* 2001; 47: 5,477–481.

68. Veroniki BA, Cogo E, Rios P, et al.: Comparative safety of anti-epileptic drugs during pregnancy: a systematic review and network meta-analysis of congenital 74srmations and prenatal outcomes. *BMC Medicine* 2017; 15:95.
69. De Jong J, Garner E, de Jong-van den Berg LTW, et al.: The Risk of Specific Congenital Anomalies in Relation to Newer Antiepileptic Drugs: A Literature Review. *Drugs-Real World Outcome* 2016; 3:131–143.
70. Etemad L, Mpshiri M, Moallem SA: Epilepsy drugs and effects on fetal development: Potential mechanisms. *J Res Med Sci* 2012; 17(9): 876–881.
71. Lin KJ, Mitchell AA, Yau WP, et al.: Maternal Exposure to Amoxicillin and the Risk of Oral Clefts. *Epidemiol* 2012; 23(5): 699–705.
72. Krapels IPC, van Rooij IALM, Ocke CC, et al.: Maternal Nutritional Status and the Risk for Orofacial Cleft Offspring in Humans. *J. Nutr* 2004; 134(11): 3106–3113.
73. Dreier JW, Andersen AN, Beckhoff GB: Systematic Review and Meta-analyses: Fever in Pregnancy and Health Impacts in the Offspring. *Pediatrics* 2014; 133: e674–e688.
74. Hashmi SS, Gallaway MS, Waller DK: Maternal fever during early pregnancy and the risk of oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88(3): 186–94.
75. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al.: Cell Viability Assays. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Sittampalam, 2013.
76. MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Epicentre, an Illumina company, California, USA, 2012.
77. NanoDrop One User guide. Thermo Fischer Scientific Inc, 2016.
78. Wilson K, Walker J: Principle and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, seventh edition. Cambridge University Press, New York, 2010: 178–187.
79. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108–145.
80. Keer JT, Birch L: Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach. RCS Publishing, Cambridge, 2008: 132–147.

81. Mlinarič - Raščan I: Farmakogenomika. Učbenik. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
82. De La Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, et al.: Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping Assays and the SNPlex™ Genotyping System. *Mut Res* 2005; 573: 111–135.
83. Sharma N, Nautiyal SC, Kumari S: High Resolution Melt Curve Analysis – An Innovative Approach for Molecular Diagnosis. *Webmed Central Rev* 2013; 4(3).
84. Roche Life Science. Technical Note No. LC 18/2004: Assay Formats for Use in Real-Time PCR. Dostop: 1.4.2017:
<http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/Assay%20Formats%20for%20use%20in%20Real-Time%20PCR.pdf>
85. A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. Applied Biosystems, 2009.
86. Viera AR, Orioli IM: Birth order and oral clefts: A meta analysis. *Teratol* 2002; 66: 209–216.
87. Herkrath AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV: Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. *J Dent* 2012; 40(1): 3–14.
88. Stott-Miller M, Heike CL, Kratz M, Starr JR: Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case–control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2010; 24(5): 502–512.
89. Hrubec TC, Toops KA, Holladay SD: Modulation of Diabetes Induced Palate Defects by Maternal Immune Stimulation. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009; 292(2): 271–276.
90. Janssen RA, Rothman I, Schwartz SM: Congenital malformations in newborns of women with established and gestational diabetes in Washington State, 1984–91. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1996; 10: 52–63.
91. Correa A, Gilboa SM, Besser LM, et al.: Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 237.e1–237.e9.
92. Martelli DRB, Machado RA, Swerts MSO, et al.: Non sindromic cleft lip and palate: relationship between sex and clinical extension. *Braz J Otorhinolaryngol* 2012; 78(5): 116–20.

93. Mossey PA, Modell B: Epidemiology of Oral Clefts 2012: An International Perspective. Cobourne MT (ed): Cleft Lip and Palate. Epidemiology, Aetiology and Treatment. Front Oral Biol Basel, Karger 2012; 16, 1–18.
94. O'Neill J: Do folic acid supplements reduce facial clefts? Evid Based Dent 2008; 9(3): 82–83.
95. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughy DR, Abyholm F, et al.: Folic acid supplements and risk of facial clefts:national population based case-control study. BMJ 2007; 334(7591): 464.
96. Johnson CY, Jittle L: Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? Int J Epidemiol 2008; 37 (5): 1041–1058.
97. Kelly D, O'Dowd T, Reulbach U: Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study. Br J of Gen Prac 2012; 466–472.
98. Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith JJ, et al.: Folate and clefts of the lip and palate-a U.K.-based case-control study: Part I: Dietary and supplemental folate. Cleft Palate Craniofac J 2008; 45(4): 420–427.
99. Vujkovic M, Ocke MC, Van der Spek PJ, Yazdanpanah N, Steeger EA, Steegers-Theunissen RP: Maternal Western dietary patterns and the risk of developing a cleft lip with or without a cleft palate. Obstet Gynecol 2007; 110(2 Pt1): 378–384.
100. Hozyasz KK, Ruszczyńska A, Bulska E: Low zinc and high copper levels in mothers of children with isolated cleft lip and palate. Wiad Lek 2005; 58(7–8): 382–385.
101. Pitkin RM: Folate and neural tube defects. Am J Clin Nutr 2007; 85: 285S–288S.
102. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu Y: Folic Acid Supplementation and Pregnancy: More Than Just Neural Tube Defect Prevention. Rev Obstet Gynecol 2011; 4(2): 52–59.
103. Ebadifar A, Ameli N, Khorramkhorshid HR, et al.: Evaluating the role of maternal folic acid supplementation in modifying the effects of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T and A1298C) gene polymorphisms in oral cleft children. J Res Med Sci 2016; 21:59.
104. Karas Kuzelicki N, Milek M, Jazbec J, Mlinarič-Raščan I: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL). Leuk Res 2009; 33: 1344–8.

105. Pan Y, Zhang W, Ma J, et al.: Infants' MTHFR polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility: A meta-analysis based on 17 case-control studies. *Am J Med Genet Part A* 2012; 158A: 2162–2169.
106. Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, et al.: Maternal MTHFR Variant Forms Increase the Risk in Offspring of Isolated Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Hum Mutat* 2012; 24:104–105.
107. Ogino S, Wilson BR: Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677C>T and 1298A > C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Gen* 2003; 48: 1–7.
108. Cheviar C, Perret C, Bahuau M, et al.: Fetal and Maternal MTHFR C677T Genotype, Maternal Folate Intake and the Risk of Nonsyndromic Oral Clefts. *Am J Med Genet Part A* 2007; 143A: 248–257.
109. Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, et al.: Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol* 2003; 157(12): 1083–91.
110. Estandia - Ortega B, Velazquez-Aragon JA, Alcantara-Ortigoza MA, et al.: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms and gene-environment interaction analysis in non-syndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 2014; 122: 109–113.
111. Luo YL: Association between MTHFR polymorphisms and orofacial clefts risk: A meta-analysis. *Birth Defects Res. A Clin Mol Teratol* 2012; 94(4): 237–44.
112. Bohanc P, Dolžan V: Genetski polimorfizmi encimov v presnovnopoliti folata v zdravi slovenski populaciji. *Raziskovalni prispevek, ZDRAV VESTN* 2004; 73: 807–13.
113. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R: A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 317–23.
114. Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Hendricks K, Suarez L, Canfield M, Finnell RH: Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risk for neural tube defects. *Mol Genet Metab* 2003; 78: 216–21.

115. Relton CL, Wilding S, Pearce MS, et al.: Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK. population. *J Med Genet* 2004; 41: 256–60.
116. Nascimento de Aquino S, Ryuichi H, Bagordakis E, et al.: MTHFR rs2274976 Polymorphism Is a Risk Marker for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Brazilian Population. *Birth Defects Res* 2013; (Part A) 100:30–35, 2014.
117. Zhao HL, Zhang J, Zhang M, et al.: Is MTHFD1 polymorphism rs 2236225 (c.1958G > A) associated with the susceptibility of NSCL/P? A systematic review and meta-analysis. *Res* 2016; 4:142.
118. Zhu H, Curry S, Wen S, et al.: Are the Betaine-Homocysteine Methyltransferase (BHMT and BHMT2) Genes Risk Factors for Spina Bifida and Orofacial Clefts? *Am J Med Gen* 2005; 135A: 274–277.
119. Štruc T: Vloga polimorfizmov v genih za izbrane metiltransferaze pri nastanku orofacialnih shiz. Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2016.
120. Beagle B, Yang TL, Hung J, Cogger EA, Moriarty DJ, Caudill MA: "The glycine N-methyltransferase (GNMT) 1289 C-->T variant influences plasma total homocysteine concentrations in young women after restricting folate intake". *J Nutr* 2005; 135 (12): 2780–5.
121. Montgomery KG, Liu MC, Eccles DM, Campbell IG: The DNMT3B C-->T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004; 6(4): R390-4.
122. Juriloff DM, Harris MJ: Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 2000; 9(6): 993–1000.
123. Chang H, Zhang T, Zhang Z, et al.: Tissue-specific distribution of aberrant DNA methylation associated with maternal low-folate status in human neural tube defects. *J Nutr Biochem* 2011; 22(12): 1172–1177.
124. Okano M, Bell DW, Haber DA, et al.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99(3): 247–257.

125. Klun J: Vpliv polimorfizmov v genih, katerih produkti sodelujejo pri privzemu, poliglutamaciji in redukciji folne kisline, na pojavnost orofacialnih shiz v slovenski populaciji. Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2015.
126. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, et al.: Apolymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 310–315.
127. Kumari P, Ali A, Sukla KK, et al.: Lower incidence of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in females: is homocysteine a factor? *J Biosci* 2013; 38(1): 21–26.
128. Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, et al.: Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 689–693.
129. Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP.: Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet* 2006; 69(6): 512–517.
130. Pei L, Zhu H, Zhu J, et al.: Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial defects and congenital heart defects in China. *Ann Epidemiol* 2006; 16: 352–356.

7. PRILOGE

Priloga 1: Anketni vprašalnik, ki so ga izpolnile matere.

Analiza bioloških označevalcev presnove folatov pri ugotavljanju tveganja za nastanek orofacialnih shiz

Splošni podatki

Koda preiskovanke:

(izpolni oseba, odgovorna za študijo)

Datum:

Datum

rojstva:

Telesna

višina:

_____ cm

Telesna masa:

_____ kg

Status

kajenja:

☐ kadim

☐ nikoli nisem
kadila

☐ nekoč sem kadila

Če ste bivša kadilka, od kdaj ne kadite
več?

Ste prenehali kaditi med nosečnostjo?

_____ *DA*

_____ *NE*

Izobrazba:

- ☐ osnovna šola
- ☐ srednja poklicna šola
- ☐ gimnazija
- ☐ višja šola
- ☐ univerzitetna
izobrazba
- ☐ magisterij ali
doktorat

Tip vzorca: ☐ bris bukalne sluznice
☐ polna kri, EDTA
☐ bris b. sluznice in
polna kri

Datum

odvzema: _____

Podatki o poteku zdajšnje ali preteklih nosečnosti

Vaše trenutno stanje: ☐ sem noseča
☐ dojim
☐ ne dojim

Predvideni datum poroda (*izpolnijo le noseče*

ženske): _____

Število nosečnosti (*pred trenutno nosečnostjo*): _____

Število živorojenih otrok: _____

Število splavov (spontanih ali
spodbujenih): _____

Imam otroka z/s:

- ☐ napako nevralne cevi
☐ prirojeno srčno napako
☐ orofacialno shizo
☐ drugo prirojeno napako
☐ otrok nima klinično potrjene prirojene
napake

Diagnoza (šifra): _____

Operativna korekcija:

DA

NE

Vzorec otroka:

- ☐ bris bukalne sluznice
☐ polna kri, EDTA

- ☐ bris b. sluznice in polna kri
- ☐ nimamo vzorca

Datum odvzema: _____

Ali se je v vaši družini že rodil otrok z eno izmed prirojenih motenj? DA NE

Če da, katero?

- ☐ napako nevralne cevi
- ☐ prirojeno srčno napako
- ☐ orofacialno shizo
- ☐ drugo prirojeno napako

Vaše sorodstveno razmerje s tem otrokom
(le, če ste na prejšnje vprašanje odgovorili z DA):

- ☐ mati
- ☐ sestra
- ☐ teta
- ☐ sestrična
- ☐ babica

Podatki o stanju nosečnosti, v kateri ste rodili otroka z okvaro nevralne cevi/ s prirojeno srčno okvaro/z orofacialno shizo

Datum rojstva otroka: _____

Vaša telesna masa pred zanositvijo: _____ kg

Spol otroka: M Ž

Sladkorna bolezen pred nosečnostjo: DA NE

Nosečniška sladkorna bolezen: DA NE

Ali imate katero drugo kronično bolezen? DA NE

Če da, katero/-e:

Ali ste med nosečnostjo jemali zdravila za zdravljenje epilepsije?	DA	NE
--	----	----

Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila?	DA	NE
--	----	----

Če da, katera:

Ali ste imeli v prvem trimestru nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38 °C?	DA	NE
--	----	----

Ali ste v prvem trimestru zahajali v savno?	DA	NE
---	----	----

Ali ste pred zanositvijo jemali pripravke s folno kislino?	DA	NE
--	----	----

Če da, katere:

Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali pripravke s folno kislino?	DA	NE
--	----	----

Če da, katere:

Kdaj ste začeli jemati folno kislino?	☐ pred zanositvijo
	☐ pred izostankom menstruacije
	☐ takoj po izostanku menstruacije
	☐ več kot 1 teden po izostanku menstruacije

Ali ste folno kislino jemali redno vsak dan?	☐ DA
	☐ NE, občasno sem pozabila vzeti tableto
	☐ NE, po tabletah mi je slabo
	☐ NE, ni se mi zdelo potrebno

Ali ste poleg pripravkov s folno kislino pred in/ali med nosečnostjo jemali še katere druge (multi)vitaminske pripravke?	DA	NE
--	----	----

Če da, katere:

0 1 2 3 4 5

Kako podobna sedanji prehrani je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred to zanositvijo? (0–se ne spominjam; 1–popolnoma drugačna, 5–praktično enaka)

Podatki o stanju med zadnjo neprizadeto nosečnostjo

Datum rojstva otroka: _____

Vaša telesna masa pred zanositvijo: _____ kg

Spol otroka: M Ž

Sladkorna bolezen pred nosečnostjo: DA NE

Nosečniška sladkorna bolezen: DA NE

Ali imate katero drugo kronično bolezen? DA NE

Če da, katero/-e: _____

Ali ste med nosečnostjo jemali zdravila za zdravljenje epilepsije? DA NE

Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila? DA NE

Če da, katera: _____

Ali ste imeli v prvem trimestru nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38 °C? DA NE

Ali ste v prvem trimestru zahajali v savno? DA NE

Ali ste pred zanositvijo jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere: _____

Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali pripravke s folno kislino? DA NE

Če da, katere: _____

Kdaj ste začeli jemati folno kislino? ☐ pred izostankom menstruacije
☐ takoj po izostanku menstruacije

- ☐ več kot 1 teden po izostanku menstruacije

Ali ste folno kislino jemali redno vsak dan?

- ☐ DA
☐ NE, občasno sem pozabila vzeti tableto
☐ NE, po tabletah mi je slabo
☐ NE, ni se mi zdelo potrebno

Ali ste poleg pripravkov s folno kislino pred in/ali med nosečnostjo jemali še katere druge (multi)vitaminske pripravke?

DA

NE

Če da, katere:

Kako podobna sedanji prehrani je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo? (0–se ne spominjam; 1–popolnoma drugačna, 5–praktično enaka)

0 1 2 3 4 5

Prehrana v zadnjih 4 tednih

V spodnji tabeli označite, kako pogosto ste v zadnjih 4 tednih uživali naslednja živila. Ovrednotite pogostost po naslednji lestvici:

0 Nikoli

1 1–3-krat na mesec

2 1-krat tedensko

3 2–4-krat na teden

4 5–6-krat na teden

5 1-krat dnevno

6 2–3-krat na dan

7 4–5-krat na dan

8 več kot 6-krat na dan

Živilo	Pogostost uživanja v zadnjih 4 tednih								
mleko in mlečni izdelki	0	1	2	3	4	5	6	7	8
mleko									
jogurt									
sir									
parmezan									
sadje in sadni sokovi	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pomarančni sok									
sok grenivke									

pomaranče									
grenivke									
banane									
ananas									
melone									
jagode									
maline									
zelenjava	0	1	2	3	4	5	6	7	8
paradižnikov sok									
paradižnikova omaka									
svež paradižnik									
rdeča pesa									
brokoli									
špinača									
koleraba									
zelena solata									
šparglji									
redkvice									
brstični ohrovt									
kitajsko zelje									
žitarice, stročnice, semena in oreški	0	1	2	3	4	5	6	7	8
fižol									
riž									
koruza									
grah									
leča									
sezam (semena, olje, omaka tahini)									
brazilski oreški									
soja (napitek, kosmiči, omaka, tofu)									
pšenični kalčki									
oves (kosmiči, piškoti)									

arašidi									
čičerika									
mandlji									
indijski oreški									
sončnična semena									
bučna semena									
kruh (vseh vrst)									
polnozrnat testenine									
meso	0	1	2	3	4	5	6	7	8
ribe									
tuna									
piščanec									
puran									
svinjina									
slanina									
govedina									
jetra									
školjke									
ostalo	0	1	2	3	4	5	6	7	8
jajca (cela)									
samo rumenjak									
samo beljak									
pivo									
prehranska dopolnila	0	1	2	3	4	5	6	7	8
multivitaminska PD									
pripravki s folno kislino									
pripravki z vitamini B kompleksa									

Priloga 2: Genotipi sorojencev brez OFC za izbrane polimorfizme: MTHFR rs1801133, MTHFR rs1801131, MTRR rs1801392, MTHFD1 rs2236225, BHMT rs3733890, GNMT rs10948059, DNMT3B rs2424913, FPGS rs1544105, DHFR rs1677693 in SLC19A1 rs1051266. Sivo obarvano polje pomeni, da genotipizacija ni uspela. CH v identifikacijski številki označuje zdravega sorojenca.

Identifikacijska številka	MTHFR 677	MTHFR 1298	MTRR	MTHFD1	BHMT	GNMT	DNMT3B	FPGS	DHFR	SLC19A1
OFC_3_CH	CC	AA	AG	GA	GG	CC	CT	CC	AC	AG
OFC_4_CH	CT	AA	AG	GA	GG	CT	TT	CC	CC	GG
OFC_7_CH	CT	AA	GG	GG	GG	TT	TT	CT	CC	AG
OFC_13_CH	CC	AA	AA	GG	GG	TT	CT	TT	AA	AG
OFC_24_CH	TT	AA	AG	AA	AG	CC	CC	CT	CC	GG
OFC_32_CH	CC	CC	AA	AA	GG	CT	CT	CC	CC	AA
OFC_37_CH	TT	AA	AG	GG	AA	CT	CC	TT	CC	AG
OFC_38_CH	TT	AA	AG	GG	GG	CC	TT	TT	CC	GG
OFC_41_CH	CC	AC	GG	GA	AG	CT	CT	CC	AA	AA
OFC_43_CH	CT	AA	AG	GA	GG	CT	TT	CT	CC	AG
OFC_45_CH	CC	AA	GG	GG	AG	CT	CC	CT	CC	GG
OFC_63_CH	TT	AA	AA	AA	AG	CT	CT	CC	CA	AG
OFC_67_CH	CC	CC	AG	AA	GG	CC	TT	TT	CA	AG
OFC_76_CH	CT	AA	GG	GG	GG	CT	CT	CC	AC	AG
OFC_79_CH	CC	AA	GG	AA	GG	CT	CT	CT	AA	GG
OFC_83_CH	CC	AA	AG	GG	AG	TT	CT	CC	CC	AG
OFC_84_CH	TT	AA	AG	GA	AA	CT	CC	CT	AC	AG
OFC_94_CH	TT	AA	AG	GG	GG	CT	CT	CC	CC	AG
OFC_101_CH	CC	CC	GG	AA	GG	CT	CC	TT	CC	GG
OFC_104_CH	TT	AA	AA	AA	GG	CC	TT	CT	CC	AG
OFC_106_CH	CC	CC	GG	GA	AA	CT	TT	CT	AA	GG
OFC_108_CH	CC	CA	GG	GG	AG	TT	CC	TT	CC	GG
OFC_116_CH	TT	AA	AG	AA	AG	TT	TT	CT	AA	AG
OFC_117_CH	CC	CC	AG	GA	GG	CT	TT	CT	CC	AA
OFC_119_CH	CT	AA	AG	AA	AA	CT	CT	CT	CC	AA
OFC_124_CH	CT	AA	AG	GA	GG	TT	CT	CC	AC	AG
OFC_130_CH	TT	AA	AA	AA	GG	CT	CT	CT	AC	AG
OFC_135_CH	TT	AA	GG	AA	GG	TT	CC	CT	CC	
OFC_141_CH	CC	AA	GG	GA	AG	CT	CT	TT	CC	AG
OFC_143_CH	CT	AA	GG	AA	AG	CT	CC	CC	AC	AG
OFC_148_CH	CC	AA	GG	GG	GG	CT	CC	TT	AC	AG
OFC_154_CH	CT	AA	AA	GG	AA	CT	CC	CT	AA	GG
OFC_157_CH	CC	CC	AG	AA	AG	TT	CT	TT	AC	AA
OFC_168_CH	TT	AA	AG	GG	AA	CT	CT	CT	CC	GG
OFC_172_CH	CC	AC	AG	GA	GG	CT	TT	TT	AC	AG
OFC_176_CH	CT	AA	AG	GA	AG	CT	CT	CT	CA	AA
OFC_47_CH	CC	CC	GG	GG	GG	CT	CT	CT	CC	AG
OFC_52_CH	CT	AA	AG	GA	AG	CT	CC	CT	CC	AG
OFC_87_CH	CC	CC	AG	GA	GG	CT	TT	CT	CC	AG

OFC_100_CH	TT	AA	GG	AA	AA	CT	CC	CC	CC	GG
OFC_126_CH	CC	CC	AA	GG	GG	CT	CT	CT	CC	AG
OFC_65_CH	CC	AA	AG	AA	AG	CT	CT	TT	CC	GA
OFC_150_CH	CC	CC	AG	GG	GG	CT	CC	CC	CC	AA
OFC_153_CH	CT	CA	AA	GA	AG	CT	TT	TT	CC	GA